

DE, TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOKÉMIAI TANSZÉK

BIOKÉMIAI GYAKORLATOK

6. javított, bővített kiadás

Összeállította:

DR. KANDRA LILI

egyetemi docens

DEBRECEN, 2006

Összeállította:

Dr. Kandra Lili
egyetemi docens

Lektorálta:

Dr. Nánási Pál
professzor emeritus

Szerzők:

Borbás Anikó	tudományos segédmunkatárs
Gyémánt Gyöngyi	egyetemi tanársegéd
Dr. Kandra Lili	egyetemi docens
Keresztessy Zsolt	TMB ösztöndíjas
Dr. Kiss László	egyetemi docens

ELŐSZÓ

(az első kiadáshoz)

Az itt bemutatott biokémiai gyakorlatok gyűjteménye segédeszközként szolgál a biokémiai ismeretek elsajátításához, a biokémia elméleti összefüggéseinek felismeréséhez, a szaktudomány vizsgáló módszereiben való jártasság megszerzéséhez. A gyakorlatgyűjtemény ismeretanyaga felhasználható a természettudományi karok biológus hallgatóinak képzéséhez, a biológia szaktanárok oktatási tevékenységéhez, valamint a vegyész képzés során a biokémia biológiai vonatkozásainak megismeréséhez.

A módszerek kiválogatása adalékul szolgál a biokémia tudomány széles spektrumának megértéséhez, és megközelítési módját tekintve a könnyebben kivitelezhető, részben kvalitatív eljárásoktól, a bonyolultabb, nagy pontosságú és felbontó képességű műszeres elemzési módszerekig terjed, és a korszerű molekuláris biológiai irányok megjelölésére is szolgál.

A vizsgált vegyületek a biológiailag fontos szerves molekulák és makromolekulák főbb típusait képviselik.

A biokémiai gondolkodásmód alaposabb megszerzése érdekében röviden ismertetjük a vizsgáló eljárások elméleti alapjait, a vizsgált vegyületek biológiai szerepét, részletesen leírjuk a kísérletek menetét, valamint közöljük a reagensek készítésének receptjeit. Az egyes gyakorlatokhoz használt műszerek, eszközök manuális működtetésére vonatkozó konkrét használati utasításokat a hallgatók a laboratóriumban kapják meg.

A gyakorlatok kiválasztásánál felhasználtuk a Biokémiai Tanszék munkatársainak oktatási és kutatási tapasztalatait, valamint más egyetemek jegyzeteit.

A válogatás során tekintettel voltunk a gazdaságossági szempontokra, a vizsgálati objektumok hozzáférhetőségére és a végrehajtás időigényét is figyelembe vettük. Lehetőséget kívántunk biztosítani arra, hogy a gyakorlat vezetője az adott témakörön belül egyszerűbb vagy bonyolultabb feladatokat választhasson a rendelkezésre álló időtől és a hallgatók előképzettségétől függően.

A megnövekedett biológus hallgatói létszám szükségessé tette a jegyzet minél gyorsabb megjelentetését, így képletek és ábrák nem kerültek a jegyzetbe. A gyakorlatokra való készüléshez javasoljuk a Biokémiai előadás és az elérhető biokémia könyvek vonatkozó anyagának tanulmányozását.

Köszönet illeti Dobolyi G. Alicét a kézirat gépelésében nyújtott segítségéért.

Külön köszönetünket fejezzük ki Dr. Nánási Pál egyetemi tanárnak, aki értékes lektori véleményével segítette a jegyzet megjelenését.

A szerzők előre is köszönetet mondanak mindazoknak, akik rámutatnak a jegyzet hiányosságaira és változásokat javasolnak.

Debrecen, 1994. december

Tartalomjegyzék

ELŐSZÓ.....	3
ÁLTALÁNOS VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK.....	5
SPEKTROFOTOMETRIA	5
OPTIKAI AKTIVITÁS, FORGATÓKÉPESSÉG MÉRÉSE: POLARIMETRIA	7
ELEKTROFORÉZIS	8
KROMATOGRÁFIÁS MÓDSZEREK	11
BIOKÉMIAI ANALITIKAI MÓDSZEREK.....	26
SZÉNHIDRÁTOK VIZSGÁLATA	26
I. Szénhidrátok színreakciói, kimutatásuk.....	26
II. Szénhidrátok mennyiségi meghatározása	30
III. Cukrok vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálata	31
IV. Szacharóz savas és enzim hidrolízisének tanulmányozása polarimetrián	32
V. Monoszacharidok alditol-acetátjainak előállítás és gázkromatográfiás elválasztása.....	33
VI. Glükóz, fruktóz és szacharóz, laktóz meghatározása természetes eredetű anyagokból folyadékkromatográfiás (HPLC) és vékonyréteggromatográfiás (VRK) módszerrel	34
VII. C-vitamin meghatározása.....	36
A valódi aszkorbinsav mennyiségét a következőképpen számítjuk ki:	38
VIII. Aszkorbinsav meghatározás 2,6-diklórfenol-indofenol (DCIP) oldattal.....	38
LIPIDEK VIZSGÁLATA.....	40
I. A lipidösszetétel hatása a lipid határfelületi réteg permeabilitására.....	40
II. Neutrális zsírok összetételének vizsgálata.....	41
III. Illóolajok vizsgálata	42
IV. Lecitin kimutatása tyúktojás sárgájában és margarinban	42
V. Koleszterin kimutatása az agyban és disznózsírban	44
VI. A-vitamin kimutatása sárgarépában és csukamájolajban	46
NUKLEINSAVAK VIZSGÁLATA.....	47
I. Nukleinsavak hidrolízise	47
II. Nukleinsavak kivonása és mennyiségi meghatározása	48
III. DNS oldat hiperkróm effektusának ("olvadáspon") mérése.....	51
FEHÉRJÉK VIZSGÁLATA	53
I. Fehérjék színreakciói, kimutatásuk.....	53
II. Fehérjék kicsapása, denaturáció	55
III. Zselatin izoelektromos pontjának mérése	59
IV. Fehérjék tisztítása dialízissel.....	61
V. Szérum aminosav tartalmának meghatározása ioncserélő vékonyréteggromatográfiával és hagyományos VRK-val.....	61
VI. Sephadex G-25 oszlop térfogati paramétereinek meghatározása.....	63
VII. Szérumfehérjék mennyiségi meghatározása és frakcionálása	64
VIII. Szérumfehérjék sómentesítése méretkizárási kromatográfiával.....	65
IX. Lizozim izolálása tojásfehérjéből gélekromatográfiával	67
X. Fehérjék molekulatömegének meghatározása SDS-poliakrilamid gradiens gélelektroforézissel	69
ENZIMOLÓGIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK.....	71
AZ ENZIMEK MŰKÖDÉSÉNEK ELMÉLETI ALAPJAI.....	71
I. NÖVÉNYI KATALÁZ VIZSGÁLATA	75
II. TIROZINÁZ ENZIM KIMUTATÁSA BURGONYA HÁJÁBAN	77
III. α -AMILÁZ AKTIVITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA.....	78
ZSIROK EMÉSZTÉSE, AZ EPE VIZSGÁLATA.....	81
AZ ACETIL-KOLIN ÉSZTERÁZ VIZSGÁLATA	85
ÉDES MANDULÁBÓL SZÁRMAZÓ β -GLÜKOZIDÁZ ENZIMKINETIKAI VIZSGÁLATA.....	89
AZ <i>E. COLI</i> BAKTÉRIUM β -D-GALAKTOZIDÁZÁNAK ENZIMKINETIKAI VIZSGÁLATA	95
PLAZMID DNS GYORS IZOLÁLÁSA (GYORS TESZT).....	100
PLAZMID ÉS <i>E. COLI</i> KROMOSZÓMÁLIS DNS HASÍTÁSA RESTRIKCIÓS ENDONUKLEÁZZAL	102
REAGENSEK KÉSZÍTÉSÉNEK RECEPTJEI.....	109

ÁLTALÁNOS VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK

SPEKTROFOTOMETRIA

A spektrofotometria a fényintenzitás változásának mérésén alapuló műszeres vizsgáló módszer.

Ha a fény áthalad egy anyagon, az a fény egy részét szelektíven abszorbeálja az anyagban található molekulák energiaszintjétől függően. Az abszorpciós spektrum az anyagon átmenő fény intenzitásának változása a hullámhossz függvényében.

A molekula összes potenciális energiája az elektronok energiájából, valamint a molekula vibrációs és rotációs energiájából tevődik össze. A rotációs átmenetek energiája a spektrum infravörös tartományában található, a vibrációs átmenetek a közeli infravörös tartományban, az elektron átmenetek pedig a röntgen, ultraibolya és a látható tartományban vannak.

A külső elektronok, amelyek a molekulakötések létrehozásában is részt vesznek, alacsonyabb energiával gerjeszthetők, ezek abszorpciója a spektrum ultraibolya-látható tartományában van. Az abszorpciós spektrum az anyagi minőségre jellemző, szerencsés esetben azonosításra is használható.

Ha az anyagba behatoló fény intenzitása I_0 , az anyagon áthaladó fényé I_t a transzmittancia (T) a következő egyenlettel definiálható:

$$T = \frac{I_t}{I_0}$$

Ha a mérendő anyag olyan molekulákat tartalmaz melyek abszorbeálják az adott hullámhosszú fényt a következő egyenlet érvényes:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\alpha c l}$$

ahol: α = abszorpciós koefficiens

c = az abszorbeáló molekula koncentrációja

l = az optikai úthossz

Mivel a koncentráció és a transzmittancia között az összefüggés nem lineáris, bevezették az abszorbancia fogalmát:

$$A = -\log \frac{I_t}{I_0}$$

vagyis

$$A = \alpha \cdot c \cdot l$$

A fenti összefüggés a **Lambert-Beer törvény**, a fotometria alaptörvénye. Fotometriásan azon anyagok koncentrációja határozható meg, amelyek fényelnyelése követi a Lambert-Beer törvényt. Megfelelő koncentrációtartományban ez az anyagok nagy részére érvényes.

Ha egy ismeretlen minta koncentrációját kívánjuk meghatározni, fel kell venni a kalibrációs görbét egy adott hullámhosszon ismert koncentrációjú standard alkalmazásával. A

kalibrációs görbe a mért abszorbancia a koncentráció függvényében ábrázolva. Az alkalmazott hullámhossz célszerűen az anyag abszorpciós maximumához tartozó hullámhossz, mivel a mérhető intenzitás értékek ekkor a legnagyobbak, vagyis a mérés érzékenysége és pontossága itt a legjobb. Az ismeretlen koncentrációjú minta abszorbanciájának ismeretében annak koncentrációja a kalibrációs görbéről leolvasható.

Ha egy anyagnak UV és/vagy látható tartományban nincs elnyelése, koncentrációjának meghatározására valamilyen színreakcióját használhatjuk fel. Mivel a kialakuló szín az idő függvényében erősödik, sőt a spektrum is változhat, a mérést a módszer által előírt időpontban kell végezni. Ugyanez vonatkozik a kalibrációs görbe felvételére is.

A fotometriás mérés során a következő jelenségek okozhatnak hibát:

Fényszóródás: Ha a minta kolloidális részecskéket tartalmaz, vagy más olyan szennyezőt amely a beeső fényt szórja, a fotométer nem a valós abszorpciót regisztrálja. Ha mód van rá az ilyen mintákat meg kell szűrni vagy centrifugálni. Ha mégis opálos mintát kell mérnünk a szórt fényből adódó hibát korrekcióba vehetjük úgy, hogy megmérjük a szórt fényt egy olyan hullámhosszon ahol a minta nem abszorbeál és az így kapott értéket levonjuk a hullámhossz maximumon mért értékből.

Oldószer párolgás: Illékony oldószerek esetén (pl: éter, aceton) zárható küvettát célszerű alkalmazni, mivel az elpárolgó oldószer miatt a minta koncentrációja nő.

Minta bomlás: Néhány anyag nagyon érzékeny az UV fényre. Ezek UV fénnnyel megvilágítva fotokémiai reakciókban vesznek részt. Az ilyen anyagok UV abszorpciója folyamatosan változik az idő függvényében.

Hőmérséklet változás: A hőmérséklet változása megváltoztathatja az oldószer térfogatát és megváltozik az abszorpciós koefficiens is. Mindkét effektus hibát okoz a koncentráció mérésben.

Szennyezett küvette: A szennyezett küvetták több fényt abszorbeálnak mint a tiszták. Ezért soha ne érintsük az optikai fényforrást és a küvette fényáteresztő részét, illetve használat előtt mindig töröljük tisztára azokat. UV tartományban használjunk kvarc küvettát, mivel az üveg és műanyag küvetták abszorbeálják az UV fényt.

OPTIKAI AKTIVITÁS, FORGATÓKÉPESSÉG MÉRÉSE: POLARIMETRIA

Azokat az anyagokat melyek a poláros fény síkját az eredeti iránytól elfordítják optikailag aktív anyagoknak, magát a jelenséget optikai aktivitásnak nevezzük.

Az optikailag aktív szénvegyületek forgatóképességének számszerű jellemzésére a fajlagos forgatóképességet $[\alpha]$ -t használják.

$$[\alpha] = \frac{l \cdot c}{100}$$

ahol: α = az elforgatás szöge (a leolvasott érték fokokban)

l = az átvilágított réteg hossza (dm)

c = az oldat koncentrációja (g / 100 ml)

Mivel $[\alpha]$ értéke függ a hőmérséklettől, a fény hullámhosszától, az oldószertől illetve a koncentrációtól, ezeket az értékeket mindig meg kell adni a forgatóképesség értékének megadásakor.

$$[\alpha]_D^{20} = -40 \quad (c = 2, \text{CHCl}_3)$$

Ez a kifejezés tehát azt jelenti, hogy a vizsgált anyag balra forgató (-), fajlagos forgatóképessége 40 , a mérést a Na D vonalának megfelelő monokromatikus fényben, 2 g / 100 ml koncentrációjú kloroformos oldatban 20 °C hőmérsékleten végeztük.

Az optikai forgatóképességet polariméterrel mérjük. A mérés elve a következő: A polarizált monokromatikus fény, amelyet általában egy Na lámpa és egy polarizátor (Nicol-féle prizma) szolgáltat, áthalad a mérendő mintát tartalmazó küvettán és az abban levő anyag a fény síkját bizonyos szögben elforgatja. Az elforgatott fénysugár egy másik Nicol-féle prizmába jut (analizátor). Egy mechanikai rendszer segítségével az analizátort addig forgatjuk, amíg a fénysugár intenzitása maximális nem lesz. Az elforgatás szögét megállapítjuk.

A méréshez alkalmazott készülékek a detektálásban, az elforgatás módjában és az elforgatás szögének mérésében különböznek egymástól. A legegyszerűbb polarimétereknél az elforgatás manuálisan, a detektálás vizuálisan (a látómező két felének fényintenzitását szemmel összehasonlítva), az elforgatás szögének leolvasása egy skáláról történik. A gyakorlaton használt készülék teljesen automatizált, a küvetta behelyezését követően az elforgatás szöge digitális kijelzőn jelenik meg.

ELEKTROFORÉZIS

Az elektroforézis töltéssel rendelkező részecskék elmozdulása elektromos erőterben. Az elmozdulás függ az alkalmazott térerőtől, a molekula töltésétől, az elválasztás időtartamától. Az egységnyi idő alatt, egységnyi térerő hatására történő elmozdulás a molekula *elektroforetikus mobilitását* jelenti. A fehérjék töltése a pH függvénye, így az elektroforetikus mobilitás megadásakor mindig utalni kell a puffer pH-jára, ionerősségére, összetételére.

Az elektroforézisnek két formája ismeretes annak megfelelően, hogy a molekulák folyadékban vándorolnak (*szabad elektroforézis*), vagy valamilyen hordozó közegben (*zóna elektroforézis*). A két forma csak módszerében különbözik egymástól.

A zóna elektroforézis hordozója lehet szűrőpapír, cellulózacetát-membrán, agar-, keményítő-, poliakrilamid-gél elektroforézis során érvényesül a gél "molekulaszűrő" hatása is. A klinikai rutin laboratóriumokban igen elterjedt a cellulóz-membrán és az agar-gél elektroforézis, s mindkettő immundiffúzióra, immunelektroforézisre is alkalmas. A legújabb elektroforézis technika a kapillár-elektroforézis, melyben a hordozó kis átmérőjű kvarc kapilláris, vagy arra felvitt hordozó anyag. Számos előnye van a hagyományos elektroforézis technikákkal szemben. Detektálási módja általában fotometriás, ezért rendkívül érzékeny, kis mintamennyiségeket és kevés puffert igényel, a kapilláris többször használható, ezért jól reprodukálható, egyszerűen alkalmazható technika.

Biokémia gyakorlaton csak a zóna-elektroforézis különböző típusaival találkozunk, melyek közül a következőkben részletes ismertetőt adunk a poliakrilamid-gél elektroforézisről.

Poliakrilamid-gél elektroforézis (PAGE)

A poliakrilamid gélen mint hordozón végzett különböző elektroforetikus módszereket széleskörűen alkalmazzák a modern fehérje- és nukleinsav kutatásban.

A poliakrilamid gél akrilamid és N,N'-metilén-bisz-akrilamid polimerizációs terméke. A monomer akrilamidból felépülő poliakrilamid láncokba beépül a térhálósító bisz-akrilamid, s több szomszédos láncsal is kapcsolatot teremt. Így a töltéskülönbségen alapuló szétválasztással egyidőben a molekula alak és méret szerinti elválása is lejátszódik a térhálós poliakrilamid gélben, ami a poliakrilamid gél rendkívül nagymértékű felbontóképességét adja. A gél rácsszerkezetét, azaz a szomszédos láncok közötti keresztkötések számát, az akrilamid monomer koncentrációjának és a térhálós szerkezet kialakítását biztosító metilén-bisz-akrilamid koncentrációjának a százalékos aránya határozza meg. A gél rácsszerkezete pedig a gél átlagos pórusméretét adja. A gél átlagos pórusmérete szabja meg, hogy a molekulaszűrő hatás milyen molekulaszűrtartományban effektív.

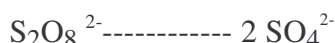
A poliakrilamid kedvező tulajdonságai:

A poliakrilamid gél igen előnyös és alkalmas közeg az elektroforézis számára. A gél mechanikai tulajdonságai 4-20 % akrilamid koncentrációtartományban nagyon kedvezőek. A poliakrilamid hidofil karakterű, nem tartalmaz azonban töltött csoportokat. Kémiaiilag közömbös, stabil vegyület, fehérjékkel, nukleinsavakkal nem lép specifikus kölcsönhatásokba, továbbá nem zavarja az azok detektálására szolgáló különböző festési reakciókat. Kompatibilis a legtöbb általánosan használt pufferrel. Nem denaturáló körülmények közt, általában 0 °C körüli hőmérsékleten végzett elektroforézis során számos enzim megőrzi natív állapotát és így enzimatis aktivitásuk alapján detektálhatók.

Különös jelentőségre tett szert a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) jelenlétében végzett gélelektroforézis a fehérjék alegységsúlyának meghatározásában.

A poliakrilamid gél képződésének optimális körülményei:

Akrlamid monomer oldatához, amely az akrilamid mennyiségére számított 1-3% N,N'-metilén-bisz-akrlamidot is tartalmaz, megfelelő pH-jú pufferoldatot keverünk. Az akrilamid polimerizációja gyökös folyamat. Katalizátorként leggyakrabban ammónium-peroxidiszulfátot használnak, amelyek vizes közegben lejátszódó spontán bomlása szabad gyök keletkezéséhez vezet:



Egy másik katalizátor a riboflavin, melynek látható fénnel történő gerjesztése eredményez szabad gyököt tartalmazó molekulát. Mindkét katalizátor esetében szükség van egy ún. iniciátor molekulára is a polimerizáció elindításához. Iniciátorként általában tercier aminokat alkalmaznak, leggyakrabban a tetrametilén-diamint (TEMED). Iniciátor alkalmazása azért szükséges, mert a katalizátorokból képződő primer szabad gyökök nem képesek az akrilamid kettős kötését felhasítva a polimerizációt elindítani. Képesek viszont a TEMED molekula gerjesztésére és az ekkor keletkező szabad gyök már megfelelő a polimerizáció iniciálására.

Az akrilamid polimerizálása során nagy molekulatömegű lineáris polimer keletkezik, mely vízben nagy viszkozitású oldatot képezve oldódik. Gél struktúra akkor alakul ki, ha az akrilamidhoz néhány százaléknyi bifunkciós N,N'-metilén-bisz-akrlamidot adunk. A metilén hidak összekapcsolják az egyes lineáris polimer szakaszokat, ezért az akrilamid gél egyetlen óriásmolekulának tekinthető. A gél készítése során a körülményeket (katalizátor és iniciátor koncentrációja) úgy kell megválasztani, hogy a gél "bepolimerizálása" 10-30 perc alatt lejátszódjon.

Technikai kivitelezés:

Elektroforézishez a gél két különböző formában állíthatjuk elő. A korábbi eljárás szerint a pufferrel, iniciátorral, katalizátorral összekevert akrilamid és metilén-bisz-akrlamid oldatot egyik végükön lezárt kis üvegcsövecskékbe töltjük. Ezen műveletet gyorsan kell elvégezni, mivel eközben már folyik a polimerizáció. A másik technika szerint két üveglap között akrilamid lemezt öntünk. Ilyenkor egy gélen több mintát is futtathatunk egymás mellett, ami nagymértékben megkönnyíti a kiértékelést. Ez a technika lehetővé teszi a kétdimenziós elektroforetikus szeparálások végrehajtását is.

Pufferrendszerek hatása az elektroforetikus mobilitásra:

Az elektroforézis sikerét nagyban befolyásolja a gél koncentráció és a pH helyes megválasztása. Fehérjék elektroforézisét általában az izoelektromos pontnál magasabb pH-n szokták végrehajtani. A puffer szerepe nemcsak az, hogy a pH-t állandó értéken tartsa, (ez biztosítja a reprodukálhatóságot), hanem a puffer ionjai végzik az áram vezetését is.

Legtöbb esetben a fehérjeionok az áram vezetésében csak nagyon csekély mértékben vesznek részt. Ha azonban a puffer koncentrációja túl alacsony, megnő a fehérjeionok szerepe az áram vezetésében, ami rendszerint diffúz, elkenődött fehérjesávok kialakulásához vezet. Az optimálisnál nagyobb pufferkoncentráció esetében viszont a fehérjék mobilitása csökken, ami szintén károsan befolyásolja az elválasztás minőségét.

Az alkalmazott pufferrendszerek szempontjából a különböző gélelektroforetikus technikákat két nagy csoportra oszthatjuk. Folytonos (kontinuus) a pufferrendszer akkor ha ugyanazt a puffert alkalmazzuk a gélben és az elektroforézis tankokban. Ez a módszer igen egyszerű, azonban valamivel rosszabb a felbontóképessége, mint a jóval bonyolultabb ún. diszkontinuus pufferrendszert alkalmazó metodikáké. A diszkontinuus (diszk) technikák két különböző koncentrációjú gélt és három különböző pufferrendszert alkalmaznak. A futtató gél fölé egy ún. koncentráló gélt polimerizálnak. Ennek akrilamid koncentrációja a futtató gélénél jóval alacsonyabb, ezért itt a molekulaszűrő hatás nem érvényesül. Ha a szeparálandó makromolekulák negatív töltésűek, vagyis az elektroforézist az izoelektromos pont feletti pH-n végezzük a következő megállapítások érvényesek:

A három különböző pufferrendszerben két különböző aniont alkalmaznak. Mind a koncentráló, mind a futtató gélben a puffer anion komponense olyan ion, melynek disszociációfoka nem függ a közeg pH-jától, vagyis egy erős sav savmaradéka. Ez az ion általában a klorid ion. Az elektrolizáló puffer viszont olyan aniont tartalmaz, amely gyenge sav savmaradéka, pl. glicinát anion. A kis térfogatú fehérje mintát a koncentráló gél felszínére rétegzik. Az áram bekapcsolása után néhány perccel a fehérjeionok bejutnak a koncentráló gélbe. Minthogy a gélben csak klorid, az elektrolizáló pufferben csak glicinát anionok vannak, a koncentráló gélben kialakul egy klorid-glicinát front.

A koncentráló gél pH-ja 6,5-6,8. Ezen a pH-n a glicin disszociációfoka viszonylag csekély, és ennek következtében, ha a fehérjeionok a glicin fázisba kerülnek relatív töltésük és így mobilitásuk is nagyobb lesz mint a glicinát anionoké. A fehérje ionok tehát gyorsabban mozognak mint a glicinát anionok, viszont mihelyt a kloridfázisba kerülnek, a helyzet megfordul, itt a klorid ionok mobilitása nagyobb. Ennek következtében a fehérjék, minthogy a glicinát anionoknál gyorsabban a klorid ionoknál lassabban mozognak, a klorid/glicinát határfelületen koncentráálódnak. Ez a jelenség tükröződik a gélrész elnevezésében is.

Az elektroforézis során a klorid/glicinát határfelület végighalad a koncentráló gélen, majd belép az ún. szeparáló gélbe. Ennek pH-ja 8.8-9.0. Ezen a pH-n a glicin teljes mértékben disszociál és ezért mobilitása nagyobb lesz mint a fehérje ionoké. A klorid/glicinát front le hagyja a fehérjéket, melyek ezután különböző fajlagos töltésük következtében különböző sebességgel vándorolnak a gélben. A szeparáló gél akrilamid koncentrációját úgy kell megválasztani, hogy az elválasztani kívánt fehérje méret- tartományban a maximális molekulaszűrő hatást fejtsse ki.

Detektálási módok:

Fehérjefestés: A leggyakrabban alkalmazott fehérjefestékek a Coomassie Brilliant Blue R250, a savas Fast Green, az amidofekete és a brómfenol kék. A legérzékenyebb a Coomassie Brilliant Blue festék, mellyel már 0,1-0,5 µg fehérje is detektálható.

Enzimaktivitás mérés: Számos olyan színreakció ismeretes, melynek segítségével különböző dehidrogenázok, ATP-ázok, proteázok a poliakrilamid gélben kimutathatók. Ha fehérjefestésre nincs lehetőség, akkor a futtatás után a gélt egyenlő, 1-2 mm-es darabokra vágják és minden egyes darabbal kémcsőreakció formájában elvégzik az enzimaktivitás meghatározását.

Egyéb detektálási módok: A fehérjék detektálásának más módja az, hogy a vizsgálandó fehérjébe fluoreszcens molekulákat vagy izotóppal jelzett aminosavakat építünk be még az elektroforézis végrehajtása előtt. Mind a fluoreszcens, mind a radioaktív detektálási technika rendkívül érzékeny, sok esetben 1-10 ng a kimutathatósági határ.

KROMATOGRÁFIÁS MÓDSZEREK

A kromatográfiás eljárások vegyületkeverékek elválasztására alkalmasak azon az alapon, hogy az egyes vegyületek különböző megoszlást mutatnak a nagy felületű álló, és egy azon átfolyó mozgó fázis között. A két fázis között végbemenő egyenlőtlen megoszlás feltétele az, hogy az egyes komponensek fázisokhoz való affinitása, vagy diffúziós lehetősége a fázisokban eltérő legyen. Az elválasztás során álló és mozgó fázis érintkezik. A két fázis között beálló egyensúlyi állapotok eredményeként az anyagok gyorsabban, vagy lassabban vándorolnak. Az elválasztást eredményező határfelületi jelenségek alapján a kromatográfiás módszereket a következő csoportokba sorolhatjuk:

Adszorpció kromatográfia:

Az egyik fázisban oldott keverék egyes összetevői a másik fázis határfelületén koncentráció különbséget mutatnak. A határfelületen gyakran a komponensek koncentrációja következik be. A jelenség az adszorpció. Ha az egyik fázis mozog, a benne oldott anyagok, az álló fázison történő különböző adszorpciójuk alapján szétválaszthatók. Az álló fázis szilárd, míg a mozgó fázis folyadék, vagy gáz halmazállapotú lehet. Adszorpció jelenségek két egymással nem elegyedő folyadék határfelületén is felléphetnek, de a komponensek elválasztása szempontjából ebben az esetben jelentősebb a komponensek két fázisban mutatkozó eltérő oldhatósága.

Megoszlási kromatográfia:

Két egymással részlegesen, vagy egyáltalán nem elegyedő folyadék határfelületén az oldott anyagok megoszlási együtthatójuknak megfelelően oszlanak meg a két fázis között. A megoszlási hányados egy anyag állófázisbeli és mozgófázisbeli egyensúlyi koncentrációjának hányadosa. A megoszlási kromatográfiában az állófázis is folyadék, amelyet rendszerint nagy felületű, szilárd hordozó felületére visznek fel. Ha az álló fázis a poláros, a vele érintkező mozgó fázis apoláros (szerves)oldószer, normál fázisú kromatográfiáról beszélünk. Néhány esetben jobb elválás érhető el ha a fázisok polaritását megcseréljük. Ilyenkor az álló fázis az apoláros, a mozgó fázis pedig poláros (vizes)oldószer. Ezt fordított fázisú kromatográfiának nevezzük.

Megoszlási kromatográfia megvalósítható gáz és nem illékony folyadék fázissal is. Ebben az esetben a szilárd hordozóra rögzített folyadék fázis és a gáz fázis közti megoszlás az elválasztás alapja. Az adott hőmérsékleten az illékonyabb, vagy a folyadékfázisban kevésbé oldódó komponensek a vivőgázzal nagyobb sebességgel haladnak így elválnak a többi komponenstől.

Ioncserélő kromatográfia:

Kétfázisú rendszer képezhető duzzasztott ioncserélő szemcsék és ionokat tartalmazó vizes fázis érintkezésével is. Az ioncserélő vízben oldhatatlan makromolekula, mely felületén töltéssel rendelkező funkciós csoportokat, ioncserélő gyököket tartalmaz. Ezekhez kapcsolódik az ellentétes töltésű ellenion. A nagy töltéssel rendelkező ionok affinitása nagyobb az ioncserélőhöz, mint a kis töltésűeké. Az ioncserélő kromatográfia alapját a keverék komponenseinek töltés különbözősége képezi.

Ha az ioncserélő makromolekula töltése negatív, a hozzá kapcsolódó ellenionok pozitívak, tehát az anyag kationcserélőként működik. Ha a makromolekula töltése pozitív, akkor az anyag anioncserélő.

Azok az összetevők, amelyek iontöltésben, ionogén csoportjuk disszociációs állandójában, vagy ionméretben eltérnek egymástól az ioncserélő szemcsékhez különböző erővel kötődnek. Ezeket a tényezőket a pH és az ionerősség változtatásával befolyásolhatjuk, ezért az ioncserés kromatográfia során vizes, pufferolt eluenseket alkalmaznak.

Affinitás kromatográfia:

Az elválasztásra biospecifikus szorpció, deszorpció folyamatokat alkalmaznak. A kölcsönhatások olyan vegyületek között lépnek fel, amelyek oldatban nagy szelektivitással reagálnak egymással. Ilyenek pl. antitest-antigén, enzim-szubsztrát, enzim-inhibitor stb.

A specifikusan kapcsolódó párok egyike, funkciójának károsítása nélkül alkalmas hordozóhoz kötve a pár másik tagjának oldatból való szelektív megkötésére használható. A megkötött komponens szelektíven eluálható egy deszorbeáló folyadékkal.

Gélkromatográfia:

A gélszűrés is a kromatográfia elvén alapszik. Az álló fázist a megduzzasztott gél szemcsék képezik, a mozgó fázis a szemcsék közötti vizes oldat. A gélkromatográfia elméleti és gyakorlati vonatkozásait külön fejezetben ismertetjük.

Megkülönböztethetjük a kromatográfiai módszereket a kifejlesztés módja szerint is. Eszerint frontális, kiszorításos és eluciós kromatográfiáról beszélhetünk. A módszerek gyakorlati jelentősége egyáltalán nem azonos, a leggyakoribb az eluciós technika.

Elució: Az elválasztani kívánt keveréket, lehetőleg az eluensben oldva, kis térfogatban visszük az állófázisra. A továbbiakban a tiszta oldószert, az eluent áramoltatjuk át az állófázison. Folyamatosan ismétlődő egyensúly beállások következtében az összetevők lassan haladnak át az állófázison. Mozgásukat a komponens-állófázis-oldószer kölcsönhatás szabályozza. A komponensek teljesen elvált zónákat képeznek, közöttük a tiszta oldószer zónái vannak, így távoznak az állófázisról. A módszer mind analitikai, mind preparatív elválasztásokra alkalmas.

GÉLKROMATOGRÁFIA (Méretkizárási kromatográfia)

Az első alkalmazása óta eltelt évtizedek alatt a gélkromatográfia egyike lett a legfontosabb biokémiai elválasztási módszereknek. Számos enzim, poliszacharid, nukleinsav, fehérje és más biológiai makromolekula tisztítására alkalmazzák.

A biológiai makromolekulák olyan speciális funkciójú anyagok, melyeket in vivo a környezetükben végbement kis változások szabályoznak. A pH-ban, fémion-, kofaktor-, stb. koncentrációban történő változások lényeges hatással lehetnek a vizsgált molekulára, ezért szükségesek olyan finom elválasztási módszerek, melyek ezen faktoroktól függetlenül működnek. A gélkromatográfia egyike ezen módszereknek.

A gélkromatográfiának a szakirodalomban számos szinonim, az elválasztás mechanizmusára utaló elnevezése ismert, mint pl. géliszűrés, molekulaszűrés, kizáródási kromatográfia, géláthatolási kromatográfia. A különböző és gyakran megtévesztő terminológiák helyett egyre inkább terjed a racionális gélkromatográfia elnevezés használata.

Kolloidkémiai meghatározásuk szerint a gélek félszilárd halmazállapotú, alakállandó, rugalmas difform rendszerek, amelyek egy gélképző vegyület és a szolváló közeg kölcsönhatásából keletkeznek.

A gélekkel szemben támasztott követelmények

1. A kromatográfia kísérleti körülményei között az elválasztandó anyagokkal vagy oldószerekkel ne lépjenek kémiai reakcióba.

2. A gél szerkezetnek megfelelő kémiai stabilitása legyen. A poliszacharid-típusú gélek glikozidkötései erős ásványi savakra, a karbonsavamid tartalmú akrilamid gélek pedig lúgokra érzékenyek.

3. Mikroorganizmusoknak, bakteriális bomlásnak lehetőleg ellenállóak legyenek. A kitűnő táptalajnak tekinthető poliszacharid típusú géleket általában NaN_3 -dal (0,02%-os oldatban) védjük a fertőzés ellen.

4. A gélek szerkezete lehetőség szerint minimális ionos csoportot tartalmazzon.

5. Az azonos kémiai szerkezetű mátrix a különféle feladatok megoldására alkalmas legyen (pl. Sephadex, Bio-Gél típusok).

6. A gél előállítása során homogén, jól ellenőrizhető méretű és eloszlású, megfelelő mechanikai szilárdságú szemcsék keletkezzenek.

Gélképző anyagok

1. Természetes gélképző anyagok

A gélkromatográfia céljára először a természetes eredetű poliszacharidokat és polimereket alkalmazták. Ezek túlnyomó része, mint pl. a keményítő és az agar, ma már csak történeti érdekességű.

A természetes eredetű gélek közül napjainkban csak az agarózt használjuk.

Az agaróz D-galaktóz és 3,6-anhidro-L-galaktóz egységekből felépített lineáris poliszacharid. Az agaróz kis koncentrációju vizes oldata (0,5% alatt) is már könnyen gélt képez.

A gélek pórusmérete az agaróztartalomtól függ. Minél kisebb a gél agaróztartalma, annál nagyobb méretű molekulák képesek a gél szerkezetébe behatolni.

Makropórusos szerkezetük folytán az agarózgélek igen nagyméretű molekulák pl. nukleinsavak, poliszacharidok, nukleoproteidek, antigének stb. kromatográfiájára is használhatók. Sepharose néven kerülnek forgalomba.

2. Fél szintetikus gélképző anyagok

A fél szintetikus géleket természetes alapanyagok, elsősorban a dextrán ipari-üzemi méretű tisztításával, frakcionálásával és kémiai átalakításával állítják elő. A legismertebb fél szintetikus géleket a Pharmacia cég gyártja. Két fő típusuk a Sephadex G, amely hidrofil gél és a Sephadex LH, a Sephadex G gélekből hidroxi propilezéssel előállított organofil gél.

A Sephadex gélek alapanyaga a dextrán. A dextrán glükózegységekből 1,6-?-glükozid kötésekkel felépített lineáris poliszacharid. A polimer helyenként 1,2-, 1,3-, vagy 1,4-glükozid-kötésekkel kapcsolódó oldalláncokat tartalmaz. A nyers dextránból részleges hidrolízissel kapott 40 000 és 70 000 átlagos molekulatömegű dextrán-frakciókat epiklórhidrinrel reagáltatják. Az epiklórhidrin a dextránláncok között 1,3-glicerid-éter-kötéseket hoz létre. A keresztkötési reakciók hatására a dextránból vízben oldhatatlan hálózat keletkezik.

A keresztkötések rendszere döntően meghatározza a dextrán gélek pórusméretét és molekulatömeg (méret) szerinti frakcionálási tartományát. A keresztkötések számával csökken a gélek pórusmérete és annak a molekulatömegnek (méretnek) a határértéke, amely a gél szerkezetébe még éppen behatolhat.

3. Szintetikus gélképző anyagok

Az alapanyagok szempontjából a szintetikus gélek három csoportját különböztethetjük meg:

- akrilamid-akrilát kopolimerek
- sztirol-divinil-benzol kopolimerek
- egyéb, kevert típusú gélek

A szintetikus gélek közül az akrilamid-akrilát géleket a legelterjedtebben alkalmazták a gélkromatográfiában. Az akrilamid és a N,N'-metilén-bisz-akrilamid kopolimerizálásával állítják elő.

A poliakrilamid gél szemcse pórusméretét elsősorban a monomer akrilamid koncentrációja, másodsorban a keresztkötéseket létrehozó N,N'-metilén-bisz-akrilamid aránya határozza meg. A két tényező variálásával a gél típusok széles skálája állítható elő.

A poliakrilamid gélek poláris, hidrofil tulajdonságait a szerkezet karbonsavamid csoportjai adják. A savamidkötéseket erős lúgok megbontják, és hidrolízisük a gélek ioncserélő tulajdonságainak növekedését hozza létre. Kromatográfiai célokra a homogén méretű, duzzasztott gél szemcséket használják. A kereskedelmi forgalomba kerülő gél típusokat emulgeálós módszerrel kondenzált gyöngypolimer szemcsék formájában készítik. A homogén szemcse méretű frakciókat a duzzasztott termék szitálásával kapják. A kromatográfiai tulajdonságok szempontjából a poliakrilamid gélek reverzibilisen száríthatók. A legismertebb kereskedelmi poliakrilamid gélek a Bio-Gel P típusok.

A poliakrilamid gélek előnye a dextrán gélekkel szemben, hogy a szemcsék ridegebbek, mechanikai hatásoknak ellenállóbbak. Másik igen nagy előnyük, hogy mint szintetikus anyagok, táptalajként a mikroorganizmusok számára nem megfelelőek, és a bakteriális hatások iránt közömbösek.

A gélkromatográfia nevezéktana

Belső térfogat (V_b): az a térfogat melyet a gél belső szerkezetéhez tartozó oldószermolekulák töltenek ki.

Külső térfogat (V_k): a gél szemcsék között elhelyezkedő oldószer térfogat, tulajdonképpen a gélkromatográfia mozgó fázisa.

A gél mátrix saját térfogata (V_x): a gél szerkezetét képező polimerhálózat térfogata.

Teljes térfogat (V_t): $V_t = V_b + V_k + V_x$

Elúciós térfogat (V_e): az elválasztandó anyag megjelenéséig a gélágyon átfolyt oldószer térfogata. Az elúciós térfogat a gélágy térfogati megoszlásától, a gél minőségétől és az elválasztandó anyag tulajdonságaitól függ.

Retenciós térfogat ($V_e - V_k$): az oldott anyag által a gél fázisban elfoglalt térfogat

Elválasztási térfogat (V_{sz}): az elúciós térfogatok különbsége

$$V_{sz} = V_{e2} - V_{e1}$$

Volumetrikus megoszlási hányados (K_d):

$$K_d = \frac{V_e - V_k}{V_b}$$

Definíciója szerint a K_d csak a gél szemcsék belső térfogatának a molekulák rendelkezésére álló részét veszi figyelembe.

Másik definíció szerint:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_k}{V_t - V_k}$$

A volumetrikus megoszlási hányados az oldott anyagok molekuláinak méretétől (molekulatömegétől) és a gél belső szerkezetétől (pórusméretétől) függő anyagi állandó. Értéke 0 és 1 között változhat.

Ha $K_d = 0$, az oldott anyag molekulái a gél belső térfogatából teljesen kizáródnak, az elúciós térfogat megegyezik a gélágy külső térfogatával.

Ha $K_d = 1$, az oldott anyag molekulái a gél teljes belső térfogatát igénybe vehetik, az elúciós térfogat az oszlop teljes oldószer-térfogatával egyenlő. A $K_d = 1$ értéket csak az elektrolitok közelítik meg, és a K_d értéke a 0,8-0,9-et általában nem haladja meg. Az egynél nagyobb K_d értékek a gélkromatográfiához társuló adszorpció vagy ioncserélő folyamatokat jelzik.

A gélkromatográfia mozgófázisa

Az eluens összetétele nem befolyásolja közvetlenül az elérhető gélkromatográfias elválasztást. A töltés nélküli anyagok esetében desztillált vizet alkalmazhatunk eluensként. Általában a gélkromatográfias elválasztások vizes közegben történnek. Ha az elválasztandó anyag töltéssel bíró csoportokat tartalmaz, a megfelelő pH és ionerősség beállítására pufferoldatokat alkalmazunk eluensként, a lehetséges ionos kölcsönhatások megakadályozására. Erre a célra a nátrium-klorid is használható.

Ha a terméket liofilizálni akarjuk, illékony puffereket alkalmazhatunk. Ilyen pl. az ammónium-acetát, ammónium-bikarbonát.

A leglényegesebb szempont a gélkromatográfiás eluens kiválasztásában, annak hatása az elválasztandó molekulára. A puffer pH-ja és ionösszetétele, disszociáló közeg, vagy detergens jelenléte konformációváltozásokat, a fehérjék alegységekre történő disszociálását, enzim és kofaktor, hormon és hordozó molekulák disszociálását okozhatja, amelyet számításba kell venni a gél kiválasztásánál és az eredmények értékelésénél.

Speciális esetekben szerves oldószerek is (etanol, metanol) alkalmazhatók eluensként. Ilyen pl. az Sephadex LH gélen történő kromatográfia.

Oszlopkészítés

1. A gél duzzasztása

A gélkromatográfiában alkalmazott gélek nagyobb részét (Sephadex, Bio-Gél) száraz por formában hozzák forgalomba, ezért szükséges duzzasztásuk a megfelelő pufferben, használat előtt. A duzzasztás ideje alatt kerülni kell a keverést, mert ez a gél szemcsék roncsolódását okozhatja. A duzzasztási idő csökkenthető forró vízfürdő alkalmazásával. A szerves oldószerben történő kromatográfiánál a megfelelő Sephadex LH gél a kiválasztott szerves oldószerben duzzasztjuk.

2. Oszloptöltés

Az oszloptöltés a gélkromatográfia igen kritikus lépése. A rosszul töltött oszlop turbulens áramlást, zónaszéledést és rossz elválást okoz. A várható átfolyási sebességet is befolyásolja.

Rendszerint 75 %-os géluszpenziót alkalmazunk, melyet a felöntés előtt vákuumban légtelenítettünk. Az oszlopba öntést célszerű üvegbot mellett végezni. Az összes géluszpenziót egyszerre kell az oszlopba önteni. Az oszlop feltöltése után azonnal indítsuk meg az átfolyást, hogy egyenletes ülepedést érjünk el. Miután a gél leülepedett, az oszlopot összekötjük az eluens tároló edénnyel és még 2-3 oszloptérfogatnyi eluens folyatunk át rajta, hogy stabilizáljuk a gélágyat és ekvilibráljuk az eluenssel.

A gélkromatográfia alkalmazási területei

1. Csoportelválasztás és frakcionálás

Lényeges különbség van a két különböző elválasztási mód között.

A csoportelválasztásban a molekulák mérete közötti különbség olyan nagy, ami lehetővé teszi, hogy úgy válasszuk ki a gél, amelyre a nagy molekulák K_d értéke 0, a kis molekuláké pedig közelítőleg 1. Ilyen elválasztás pl. a makromolekulák sómentesítése, a puffercsere, és a reakciók lezárása makromolekulák és alacsony molekulatömegű reagensek között.

A frakcionálás esetén hasonló méretű, következésképpen a K_d értékben kevésbé különböző molekulák elválasztásáról van szó. Ezért a gél helyes megválasztása, és a kísérleti körülmények igen lényegesek ahhoz, hogy jó elválasztást érjünk el.

2. Molekulatömeg meghatározása

A gélkromatográfia, eltérően az elektroforetikus módszerektől, lehetőséget nyújt natív, vagy denaturált fehérjék molekulatömegének vagy méretének meghatározására, különböző pH értéknél, ionerősségnél és hőmérsékleten.

A megfelelő géllal töltött oszlopot ismert molekulatömegű fehérje standarddal kalibráljuk és a kalibrált oszlopot szinte korlátlan ideig használhatjuk mind molekulatömeg meghatározásra, mind rutin elválasztásra.

3. Polimerek molekulatömeg-eloszlásának meghatározása

A molekulatömeg-eloszlás igen fontos jellemzője mind a természetes, mind a szintetikus polimereknek. A klasszikus módszerekkel végzett analízis nehéz és fárasztó, minthogy a makromolekulákat kicsapással frakcionálja, és minden frakcióban meghatározza a molekulatömeget és az anyagmennyiséget.

A gélkromatográfia jobb lehetőséget biztosít számos polimer eloszlási analízisére. Az elúciós görbét folyamatosan lehet felvenni, vagy meghatározni az egyes frakciókra. Nem szükséges külön meghatározni a polimerek molekulatömegét az egyes frakciókban, ha kalibrált oszlopot használunk, tekintve, hogy az oszlopok kromatográfiás viselkedése nagymértékben reprodukálható.

Ezzel a módszerrel számos vízoldható polimer (dextránok, zselatin preparátumok) molekulatömeg-eloszlását határozták meg.

Alacsony molekulatömeg-tartományban a Sephadex LH-20 vagy LH-60 felhasználásával, szerves oldószerekben oldódó polimerek eloszlási analízise is elvégezhető.

VÉKONYRÉTEG-KROMATOGRÁFIA (VRK)

A vékonyréteg-kromatográfia (VRK) széles körben elterjedt, elsősorban analitikai célú elválasztástechnikai módszer. Gyors és egyszerű, ezért széles körben alkalmazzák szerves anyagok kimutatására, tisztaságvizsgálatára és mennyiségi meghatározására. Erre alkalmassá teszi szelektivitása, érzékenysége, valamint az, hogy kis mintamennyiségeket igényel, ugyanakkor különböző futtatórendszereket, rétegeket és előhívókat alkalmazva szinte minden területen használható.

A vékonyréteg-kromatográfia a réteg anyagától függően lehet:

- adszorpciós vékonyréteg-kromatográfia
- megoszlási vékonyréteg-kromatográfia
- ioncserélő vékonyréteg-kromatográfia
- gélkromatográfia

Bár a rétegek házilag, manuálisan is előállíthatók, ma már a kész rétegek használata terjedt el, lévén ezek egyenletesebbek a házilag készítettéknél és minden elképzelhető szorbenssel kaphatóak analitikai és preparatív méretben egyaránt.

Az eluensek kiválasztásának megkönnyítésére szolgálnak az úgynevezett eluotróp sorok, melyekben az adott rétegen növekvő eluálóképességük szerint sorba rendezett oldószereket és oldószer rendszereket adnak meg.

Gyakorlati tudnivalók a vékonyréteg-kromatográfia alkalmazásához:

1.Minta felvitel: Az oldatban levő vizsgálati anyagot kapillárisal vagy mikrofecskendővel a lemez aljától kb. 1,5-2 cm távolságban, egymástól legalább 1 cm-re , minnél kisebb foltban cseppentjük fel. Nagyobb mintamennyiségek illetve kevésbé illékony oldószer esetén hajszárítóval, hideg, vagy ha az anyag nem hőérzékeny, meleg levegőárammal száríthatjuk.

2.Kifejlesztés vagy elució: A felcseppentett lemezt az előzetesen kiválasztott eluenst tartalmazó futtatókádba (jól zárható üvegedénybe) helyezzük. Az oldószerréteg ne érje el a felcseppentett foltokat. Az oldószer a kapilláris hatás következtében vándorol a rétegen. Általában a réteg felső szélétől 1-2 cm távolságig futtatjuk az eluenst. A jobb elválasztás érdekében alkalmazhatunk túlfuttatást, többszöri eluciót illetve két vagy több dimenziós futtatást is. A vékonyréteg-kromatográfia viszonylag új ága a nagynyomású vékonyréteg-kromatográfia, amit angol nevének rövidítése alapján OPTLC-nek (**O**verpressure **T**hin **L**ayer **C**romathography) is hívnak.Az OPTLC alkalmazásakor a hagyományos vékonyrétegen az eluenst egy pumpa segítségével nagy nyomással áramoltatják. Ily módon jelentősen lerövidíthető a futtatás ideje. Az OPTLC mintegy átmenetet képez a vékonyréteg- és a nagynyomású folyadékkromatográfia között.

3.Előhívás: Az értékeléshez a foltokat láthatóvá kell tenni. Színes anyagok esetén erre nincs szükség, de az anyagok nagy része nem színes. Ezek az anyagok UV fényben vizsgálva, vagy megfelelő reagenssel bepermetezve "előhívhatók", láthatóvá tehetők. A különböző vegyületcsoportokra számos előhívószer ismert, mint például a szerves vegyületek esetén általánosan használt cc. kénsav és jódgőz, illetve a különböző funkciós csoportok színreakcióit felhasználó speciális előhívók. Ezek számos irodalomban megtalálhatók.

4.Értékelés: A kapott kromatogramok *minőségi* értékelése az úgynevezett retenciósfaktor (R_f) alapján történik.

$$R_f = \frac{D_M}{D_F}$$

ahol: D_M = a minta foltjának távolsága a felcseppentés helyétől
 D_F = az oldószerfront távolsága a felcseppentés helyétől

A *menyiségi* értékelésre a következő módszerek használhatók:

- vizuális értékelés a folt átmérője alapján
- elució a lemezről és az oldat elemzése
- bioautográfia: biológiailag aktív anyagok esetén
- radioautográfia: radioaktív anyagokra
- denzitometria: fényvisszaverődésen alapuló fotometriás mérési módszer, mellyel a rétegen levő színes, vagy UV aktív anyagok mérhetők.

GÁZKROMATOGRÁFIA (GC)

A gázkromatográfia elsősorban analitikai célú elválasztástechnikai módszer. Az elválasztás elvi alapja a minta komponenseinek két fázis közötti különböző megoszlása. A mozgó fázis (az eluens) mindig gáz, amely az állófázisról mossa le (eluálja) a minta komponenseit. Az állófázis lehet szilárd (ebben az esetben gáz-szilárd kromatográfiáról beszélünk) vagy folyadék. Ez utóbbi a gyakoribb, ekkor gáz-folyadék kromatográfiáról beszélünk, ebben az esetben a folyadékban oldódik az elemzett anyag.

A gáz-folyadék kromatográfiában a komponenseket a vivőgáz hajtja végig az álló fázison. Az álló fázis egy nem illékony folyadék, melyet egyenletes szemcseméret-eloszlású hordozóra, vagy kapilláris cső falára vékony film formájában visznek fel. Az állófázis a minta komponenseit különbözőképpen tartja vissza a megoszlási hányadosuknak megfelelően. A komponensek a vivőgázzal együtt hagyják el a kolonnát. Ezt követően valamilyen módon detektáljuk a vivőgáz anyagtartalmát és ezt az idő függvényében ábrázoljuk.

A kromatográfiás elemzés eredménye a kromatogram, melyet a detektorjel időbeni változásának regisztrálásával kapunk. A kromatogramon az egyes komponenseknek egy-egy csúcs felel meg, vagyis az anyagkeverék legalább annyi komponensből áll, mint ahány csúcsot kapunk az elemzés során. A csúcsok maximumának megjelenési ideje a retenció idő, amely az adott elemzési körülmények között az anyagi minőségre jellemző. A csúcs alatti terület az anyagmennyiséggel arányos, mennyiségi elemzésre használható.

A gázkromatográfia igen érzékeny módszer. Szennyező komponensek meghatározásánál például ppm (10^{-6}) koncentrációjú komponens nehézség nélkül elemezhető.

A gázkromatográf felépítése:

1. Vivőgáz: A vivőgáz kémiaiilag semleges, nagy tisztaságú gáz, mely az adott rendszerben az adott detektorral használható. A vivőgáz nem léphet reakcióba sem az elemzendő anyaggal, sem az állófázissal, és nem tartalmazhat olyan szennyezőket sem, amelyek ezekkel reakcióba léphetnek. (pl. víz, oxigén) Bizonyos esetekben egyes vivőgázokat a detektor működési elve kizár. A vivőgázt nagynyomású acél palackokban tárolják, nyomáscsökkentőn keresztül egyenletes sebességgel áramoltatják át a rendszeren. Leggyakoribb vivőgázok: N_2 , He, Ar, H_2 , Ar- CH_4 elegy.

2. Injektor: Az injektor az elemzendő minta bevitelének helye. Feladata a minta teljes elpárologtatása. A minta bevitele rendszerint oldat formájában történik mikrofecskendő segítségével egy szilikongumi membrán (a szeptumon) keresztül. Az injektor a készülék többi részétől függetlenül temperálható arra a hőmérsékletre, ami a minta elpárologtatásához szükséges.

3. Kemence: A kemence tartalmazza a kolonnát. Feladata a kolonna temperálása, az elválasztáshoz szükséges hőmérséklet nagypontosságú tartása. A kemence hőmérséklete a mérés során tetszőleges sebességgel változtatható, ezt nevezzük hőmérséklet programozásnak.

4. Kolonna: A kolonna a gázkromatográf legfontosabb része, ezen történik a komponensek elválasztása. Rendszerint acélból vagy üvegből készült hosszú cső, melybe a hordozóra felvitt állófázis van betöltve. A hordozó egy kémiaiilag semleges, egyenletes szemcseméretű, nagy felületű anyag (pl. szilikát szemcsék, szintetikus gyöngypolimer). A nedvesítő, vagy állófázis vékony film formájában van a hordozón. Fontos, hogy az elemzés hőmérsékletén a nedvesítő gőznyomása elhanyagolhatóan kicsi legyen, ellenkező esetben az állófázis lassan elpárolog a hordozóról, a kolonna tönkremegy. A gázkromatográfiában több

száz különböző polaritású nedvesítő ismert. Az elemzéshez használt nedvesítő típusát mindig az elválasztási feladat határozza meg.

Igen kis belső átmérőjű csövek esetén a nedvesítő a cső belső falára van felhordva. Ezeknél a kolonnáknál a belső átmérő 0,1-0,5 mm, a kolonna hossza 10-100 m. Ezek az úgynevezett kapilláris kolonnák, melyekkel sokkomponensű elegyek elemzését is el lehet végezni. Jellemzőjük a rendkívül nagy felbontás.

5. *Detektor*: A detektor jelzi és méri a kolonnáról távozó, vivőgázban oldott anyag mennyiségét. A jó detektor érzékeny, minden típusú anyagra kb. egyformán érzékeny, az elemzés körülményeinek változtatására érzéketlen, az anyagok koncentrációjának széles tartományában jelének a koncentrációtól való függése lineáris. Ilyen ideális detektor nincs, a legáltalánosabban használt detektorok megközelítik ezeket a feltételeket.

A következőkben ismertetjük a főbb detektortípusokat. Részletesen csak a gyakorlatokon használt készüléken megtalálható két detektortípusról írunk.

a.) *Hővezetőképességi detektor (TCD)*: Egy gáz hővezetőképessége a gáz átlagos molekulásúlyától, tehát annak összetételétől függ. Az összetétel kismértékű változása a hővezetőképességben jelentős változást okozhat, ha az összetételváltozást okozó komponens molekulásúlya lényegesen eltér az eredeti molekulásúlytól. A hővezetőképesség mérésevel tehát detektálhatók a kolonnáról távozó különböző anyagok.

b.) *Lángfotometriás detektor (FPD)*

c.) *Nitrogén-foszfor detektor (NPD)*: A lángionizációs detektor elvén működő, de nitrogén és foszfor atomokra érzékenyebbé tett detektortípus.

d.) *Tömegszelektív detektor (MSD)*: A tömegspektrométer elvén működő detektortípus.

e.) *Lángionizációs detektor (FID)*: A lángionizációs detektorban egy igen kis méretű (kb. 2 mm átmérőjű és 1 mm magas) hidrogén láng ég, melyben a hőmérséklet 1500-2000 °C. Ezen a hőmérsékleten a szerves molekulák szétdarabolódnak és a bennük lévő szén a lángban lévő OH csoportokkal egy ionizációs láncreakciót indít el, minek következtében egy ionlavina keletkezik. Ezt az iontartalmú gázt két ellentétes töltésű elektród közé vezetve ionáramot kapunk, melynek erőssége a vivőgázzal a lángba bekerülő szénatomok számával arányos. Ezt az áramot mérve és erősítés után felrajzolva kapjuk a kromatogramot. A lángionizációs detektor mellett alkalmazható vivőgázok: N₂, He, Ar.

f.) *Elektronbefogásos detektor (ECD)*: Az elektronbefogásos detektor működése azon alapul, hogy a detektorcellán áthaladó vivőgáz állandó ionizálásából eredő cellaáramot, a cellán áthaladó, elektront befogni képes anyag lecsökkenti, a csökkentés mértéke az anyagmennyiséggel arányos. A vivőgáz rendszerint argon (keves metán tartalommal), vagy nitrogén. A vivőgázt trícium, vagy Ni⁶³ β-sugárzó ionforrás ionizálja folyamatosan. Az ionizált vivőgáz a cella elektródjai között egy meghatározott nagyságú áramot létesít. Ha a cellába olyan anyag érkezik, amely elektront képes befogni, az csökkenti a cellaáramot.

A detektor különösen érzékeny halogéntartalmú anyagokra, konjugációban résztvevő karbonilokra, nitrétekre, nitrátokra.

Az elektronbefogásos detektor működési elvéből adódóan csak kismértékű linearitással rendelkezik, így mennyiségi meghatározáshoz kalibrációs görbe készítése szükséges, egyetlen kalibrációs adat nem elegendő.

A kromatogramok értékelése:

Minőségi értékelés: A minőségi értékeléshez a retenció idő használható, mivel az az anyagi minőségre jellemző. A minőségi azonosítás összehasonlító mintával végezhető el. Azokat az anyagokat, melyek feltehetően a vizsgált mintában megtalálhatók, egyenként kromatografáljuk azonos körülmények között. A retenció idők hibahatáron belüli egyezése

valószínűsíti az azonosságot, biztonsággal azonban csak két eltérő polaritású kolonnán történő meghatározás és azonosítás esetén lehet az azonosságot állítani. Ismeretes összehasonlító anyag nélküli minőségi kiértékelés is. Retenciós index alapján (ez a normál paraffin szénhidrogénekhez, mint skálához viszonyítja a retenciós időket), vagy a gázkromatográffal összekapcsolt szerkezetvizsgáló készülék (leggyakrabban tömegspektrométer vagy infravörös spektrofotométer) segítségével.

Mennyiségi értékelés: A mennyiségi értékelés alapja az, hogy a detektorjel intenzitása arányos az eluálódó anyag mennyiségével. Ez azt jelenti, hogy a kromatogramon a csúcs alatti terület arányos az adott komponens mennyiségével.

$$A_i = f_i \cdot m_i$$

ahol: A_i : az i-edik komponens csúcsának területe

f_i : az i-edik komponensre vonatkozó arányossági tényező, a detektornak

arra a komponensre vonatkozó érzékenységi faktora (response faktor)

m_i : az i-edik komponens mennyisége

A mennyiségi kiértékeléshez tehát mérni kell az egyes csúcsok területét. A modern készülékek elektronikus integrátorokkal vannak ellátva, ezek gyorsan és nagy pontossággal mérik az egyes csúcsok területét és megadják a csúcsok retenciós idejét is.

a.) *Területszázalékos kiértékelés:* Ha nem ismerjük az anyagkeverék egyes komponenseinek érzékenységi faktorát, vagy feltételezhetjük, hogy a detektor a keverékünk minden komponensére nagyjából egyformán érzékeny, akkor a területszázalékos kiértékelést alkalmazhatjuk.

$$X_i = \frac{A_i}{\sum A_i} \cdot 100$$

ahol: A_i : az i-edik komponens csúcsának területe

X_i : az i-edik komponensre eső területszázalék

$\sum A_i$: az összes csúcs területeinek összege

b.) *Normalizáció:* Amennyiben az egyes komponensekre az érzékenységi faktorok eltérőek (a detektor nem egyformán érzékeny az egyes komponensekre), és ismertek, akkor a pontos súlyszázalékos (esetleg térfogat, vagy mólszázalékos) előfordulást a következőképpen határozzuk meg:

$$X_i = \frac{f_i \cdot A_i}{\sum f_i A_i} \cdot 100$$

ahol: f_i : az i-edik komponensre vonatkozó érzékenységi faktor

X_i : az i-edik komponensre vonatkozó súlyszázalék

c.) *Belső standard módszer:* A legpontosabb mennyiségi meghatározási módszer, melynek relatív hibája rendszerint 1 % alatt van. A módszer alkalmazásához ismert mennyiségben egy új komponenst viszünk a rendszerbe (ez a belső standard), ehhez viszonyítjuk a mérendő komponenst. A kiválasztandó belső standard lehetőleg kémiaiilag hasonló vegyület mint a meghatározni kívánt anyag, szilárdan és oldatban egyaránt stabil, az

adott kromatográfiás rendszerben elválasztható a minta komponenseitől és a kiindulási minta nem tartalmazza.

$$m_i = \frac{f_i \cdot A_i}{f_{st} \cdot A_{st}} \cdot m_{st}$$

ahol: m_i : a mérendő komponens abszolút mennyisége

A_{st} : a standard csúcsának területe

f_{st} : a standardra vonatkozó érzékenységi faktor

m_{st} : a standard abszolút mennyisége

A belső standard módszernél elegendő a relatív érzékenységi faktor (f_{rel}) ismerete is, ennek meghatározása lényegesen egyszerűbb is.

$$f_{rel} = \frac{f_i}{f_{st}}$$

Ekkor a meghatározandó anyagmennyiség:

$$m_i = \frac{A_i}{A_{st}} \cdot f_{rel} \cdot m_{st}$$

A belső standard módszer előnyei:

- nem fontos a belső standard pontos mennyiségének ismerete, ha a mintában és az összehasonlító oldatban egyenlő mennyiségben van jelen
- a különböző minta előkészítési hibákat kiküszöböli, ha kémiaiailag hasonló a meghatározni kívánt anyaghoz (pl. hígítás, kirázás, származékképzés hibája)
- kiküszöböli az injektálás hibáját.

A gázkromatográfia alkalmazása:

Tisztaságvizsgálat: A vizsgálandó anyagnak egyetlen csúcsot kell adnia, egyéb szennyező komponensekre utaló csúcs a kromatogramban nem lehet jelen.

Szennyező anyagok kimutatása: A gázkromatográfia nagy érzékenysége folytán ppm mennyiségben jelenlevő szennyezők kimutatására és meghatározására is alkalmas. Nagy jelentősége van az élelmiszeriparban, gyógyszergyártásban, környezetvédelemben.

Sokkomponensű mintában valamely anyag koncentrációjának pontos meghatározása: Például vér alkoholszintjének mérése, gyógyszerek metabolitjainak vizsgálata testnedvekben.

Sokkomponensű anyagok összehasonlító vizsgálata az egyes komponensek minőségének ismerete nélkül: Például illóolajok azonosítása "ujjlenyomat kromatogramok" segítségével.

Ezen kívül még számos speciális alkalmazás ismert.

NAGYNYOMÁSÚ FOLYADÉKKROMATOMATOGRÁFIA (HPLC)

A nagynyomású folyadékkromatográfia olyan kromatográfias eljárás, amelyben a mozgófázis folyadék, az állófázis szilárd vagy szilárd hordozóra felvitt folyadék. A mozgó fázist nagy nyomáson, kontrolált sebességgel áramoltatják át az állófázison. Az állófázisról kilépő eluent detektoron vezetik át, amely a vizsgálandó anyag valamilyen paraméterének mérésével folyamatosan követi a változásokat. A detektor jelének az idő függvényében való ábrázolását nevezzük kromatogramnak.

Nagynyomású folyadékkromatográfiával számos olyan anyag elválasztása megoldható, amely gázkromatográfiával vagy a hagyományos kromatográfias technikákkal nem. Ideális módszer a biokémiai szempontból érdekes makromolekulák és ionos anyagok, a bomlékony természetes eredetű termékek és egyéb igen változatos eredetű és összetételű, nagy molekulatömegű és/vagy kevésbé stabilis vegyületek, mint pl.: fehérjék, aminosavak, nukleinsavak, nukleotidok, nukleozidok, cukrok, poliszacharidok, vitaminok, szteroidok, növényi pigmentek, poláris lipidek, gyógyszerek, gyógyszer és peszticid származékok elválasztására.

A folyadékkromatográf felépítése:

Rendkívül sok cég állít elő folyadékkromatográfokat, ezek különböző technikai megoldásokat alkalmaznak, de felépítésük megfelel az itt vázoltaknak.

1. Oldószertartály: A folyadékkromatográfok többségében az oldószereket 1 l űrtartalmú üvegekben tárolják. Ezek lehetnek speciálisan kialakítottak vagy akár hagyományos üvegpalackok is. A készülékek egy részénél az oldószer gázmentesítésére is lehetőség van magában az oldószertárolóban. Leggyakrabban nitrogén vagy argon gáz átbuborékoltatásával, melegítéssel vagy intenzív keverés közben vákuum alkalmazásával oldják meg az eluensben oldott gáz -elsősorban oxigén- eltávolítását. Erre azért van szükség, mert buborék képződhet a szivattyúban, ami zavarja az egyenletes oldószer áramlást, az oldott gáz reagálhat az álló vagy mozgó fázissal, vagy buborék képződhet a detektorban, ami zavarja az érzékelést.

2. Szűrő: A készülékben alkalmazott kis átmérőjű kapillárisok, valamint a kis szemcseméretű oszlopok miatt az oldószer nem tartalmazhat mechanikai szennyeződések. Ezért az alkalmazott oldószert használat előtt 0.45 µm pórusméretű szűrőn át kell szűrni. Az esetleg később kiváló szennyeződések kiszűrésére a szivattyú előtt és a kolonna előtt kis pórusméretű, nyomásálló szűrőt alkalmaznak.

3. Szivattyúrendszer: A nagynyomású folyadékkromatográfok egyik legfontosabb eleme a szivattyúrendszer. Az alkalmazott folyadékszállító rendszerrel szemben támasztott követelmények:

- korrózióálló legyen
- 250 - 400 bar nyomáson tudja az eluent szállítani
- pulzálásmentes legyen
- az eluensszállítás legalább 3 ml/perc sebességű legyen
- a sebesség ingadozása 1-2 %-nál ne legyen nagyobb
- kicsi legyen a holtterfogata
- alkalmas legyen gradiensképzésre

4.Nyomásmérők: A kolonnára kerülő eluens nyomását érzékelik. A nyomásváltozása a szivattyú hibáját, vagy az oszlop illetve valamelyik kapilláris eltömődését jelzi.. Az újabb készülékekben a nyomásmérők biztonsági szerepet is ellátnak, egy adott nyomás elérése esetén hibajelzést adnak és kikapcsolják a szivattyút.

5.Mintabemérők: Az elemezni kívánt minta kolonnára juttatását szolgálják. A legegyszerűbb megoldásnál egy rugalmas anyagból készült szeptumon át fecskendővel juttatják be a mintát. Ennek előnye a változtatható térfogat, hátránya a rossz reprodukálhatóság, valamint hogy csak kb. 100 bar nyomásig használható..

Másik megoldás a mintabemérő szelep (loop). Ebben az esetben egy állandó, ismert térfogatú hurokba injektálják a mintát, amelyből az injektor szelep elfordításakor az eluens mosza rá a kolonnára. Ennek előnye a pontosság, jó reprodukálhatóság, hátránya, hogy az injektált térfogat változtatása csak a mintabemérő hurok cseréjével oldható meg.

A legpontosabb és legkényelmesebb megoldás az automata injektor.

6.Kolonna: A kolonnák vagy nagynyomású folyadékkromatográfás oszlopok, saválló acélból vagy üvegből készült, különböző töltetekkel töltött oszlopok. Méretük analitikai célú elválasztásokhoz általában 100 x 4.6 mm és 300 x 4.6 mm között változik. Töltetük az elválasztási feladattól függően többféle lehet.

Töltet típusok:

Normál fázisú:	Szilikagél	Poláros állófázis. Apoláros eluenssel, elsősorban poláros anyagok elválasztására használják.
Poláros kötött fázisú:	NH ₂ amino CN ciano Diol	Szilikagélhez kémiaiilag kötött módosító csoportok. Stabilabb mint a szilikagél, vizes eluenssel is használható.
Fordított fázisú:	RP 2 RP 4 RP 8 RP 18	Szilikagélhez kémiaiilag kötött apoláros csoportok. A számok a szénlánc hosszát jelölik. Poláros eluensekkel főleg apoláros, kevésbé poláros anyagok Difenilelválasztására használják.
Ioncserélő:	Kation Anion	
Különleges kolonnák:	Deaktivált (bázisok elválasztására) Királis Szénhidrát Gél USP (gyógyszerek elválasztására)	

7.Detektorok: Az ideális detektor a következő követelményeknek felel meg:

- nagy érzékenységû
- minden komponensre reagál, vagy specifikitása ismert
- a detektorjel nagysága nem függ az eluens hőmérséklet, vagy térfogatsebesség változásától
- nem okoz oszlopon kívüli sávszélesedést
- megbízható és kényelmesen használható
- a komponenseket nem roncsolja el
- a jel széles koncentrációtartományban arányos az anyag mennyiségével
- a detektált csúcsról kvalitatív információt is nyújt.

Fontosabb detektortípusok:

Fotometriás : fix, vagy változtatható hullámhosszú UV/VIS, diódasoros detektor

Refraktív index : a törésmutató változás mérésén alapuló általános detektor

Lángionizációs

Vezetőképességi

Radiokémiai

Polarográfiás

A kromatogramok értékelése:

Minőségi értékelés: A minőségi értékeléshez a retenciós idő használható, mivel az az anyagi minőségre jellemző. A minőségi azonosítás összehasonlító mintával végezhető el. Azokat az anyagokat, melyek feltehetően a vizsgált mintában megtalálhatók, egyenként kromatografáljuk azonos körülmények között. A retenciós idők hibahatáron belüli egyezése valószínűsíti az azonosságot, biztonsággal azonban csak két eltérő polaritású kolonnán történő meghatározás és azonosítás esetén lehet az azonosságot állítani.

Mennyiségi értékelés: A mennyiségi értékelés alapja az, hogy a detektorjel intenzitása arányos az eluálódó anyag mennyiségével. Ez azt jelenti hogy a kromatogramon a csúcs alatti terület arányos az adott komponens mennyiségével.

$$A_i = f_i \cdot m_i$$

ahol:

A_i : az i-edik komponens csúcsának területe

f_i : az i-edik komponensre vonatkozó arányossági tényező, a detektornak arra a komponensre vonatkozó érzékenységi faktora (response faktor)

m_i : az i-edik komponens mennyisége

A mennyiségi értékeléshez tehát mérni kell az egyes csúcsok területét. A modern készülékek elektronikus integrátorokkal vannak ellátva, ezek gyorsan és nagy pontossággal mérik az egyes csúcsok területét és megadják a csúcsok retenciós idejét is.

- Területszázalékos kiértékelés.
- Normalizáció.
- Belső standard módszer.

BIOKÉMIAI ANALITIKAI MÓDSZEREK

SZÉNHIDRÁTOK VIZSGÁLATA

I. Szénhidrátok színreakciói, kimutatásuk

A szénhidrátok polihidroxi-aldehidek vagy -ketonok, ezért a hidroxil és az aldehid- vagy ketoncsoportra jellemző kémiai reakciókat mutatják.

1. Savas- hidrolízis termékek színreakciói:

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány, kémcsőfogó
savpipetták (1,2,5,10-ml-es)
Bunsen-égő
üvegbot
pH papír

Anyagok: 1 %-os glükóz, fruktóz, ribóz, arabinóz, maltóz, szacharóz,
laktóz oldat
10 %-os alkoholos α -naftol
Bial reagens
Seliwanoff-reagens
antron reagens (0,2 %-os antron/cc.H₂SO₄)
Fehling I
Fehling II oldat
Benedict-reagens
Barfoed-reagens
telített Na₂CO₃ oldat
cc. H₂SO₄
etanol

a.) Molisch próba

Valamennyi cukorra jellemző: az alkoholos α -naftol furfurollal, amely a pentózokból és 5-(hidroxil-metil)-furfurollal, amely a hexózokból képződik, lila színű terméket ad.

Feladat:

2 ml 1 %-os glükóz oldathoz adjunk 2 csepp Molisch reagenst (alkoholos α -naftol), majd - ferdén tartva a kémcsövet - savpipettával óvatosan rétegezzünk az oldat alá 3 ml tömény kénsavat. A kénsav és a cukoroldat érintkezésénél ibolyaszínű gyűrű keletkezik.

b.) Bial próba

Pentózok és hexózok megkülönböztetésére alkalmas: az orcin furfurollal kék színű, míg hidroximetil-furfurollal barna terméket ad.

Feladat:

3 ml Bial-reagenshez adjunk 2 ml 1 %-os arabinóz oldatot. Melegítés hatására az oldat kék lesz. Ismételjük meg a reakciót 1 %-os glükóz, xilóz, fruktóz, és laktóz oldattal.

c.) Seliwanoff próba

Feladat:

Hexózok kimutatására alkalmas: a rezorcin 5-(hidroximetil)-furfurollal piros színű terméket ad. A próba alkalmas aldózok és ketózok megkülönböztetésére: savas hidrolízis során a ketohexózok sokkal gyorsabban alakulnak át hidroximetil-furfurollá, mint az aldohexózok, így a Seliwanoff-próbát sokkal hamarabb és intenzívebb színnel adják.

Feladat:

5 ml Seliwanoff-reagenshez adjunk 5 csepp 1 %-os fruktóz oldatot, majd melegítsük a vörös szín megjelenéséig. Ismételjük meg a reakciót 1 %-os glükóz, szacharóz és maltóz oldattal.

d.) Antron teszt

Valamennyi cukor (mono- és poliszacharid) kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmas az antron-teszt: az antron cukorral $\text{cc.H}_2\text{SO}_4$ -as oldatban zöldeskék színt ad, a színintenzitás arányos a cukor mennyiségével.

Feladat:

Tegyünk két kémcsőbe 2-2 ml antron-reagenst (0,2 %-os antron / $\text{cc.H}_2\text{SO}_4$), az egyikhez 0,2 ml, a másikhoz 0,5 ml 0,1 %-os glükóz oldatot adjunk. Alaposan rázzuk össze az oldatokat és forró vízfürdőn melegítsük 3 percig. Lehűlés után hasonlítsuk össze a színüket. Ha az oldat opálos lesz, adjunk hozzá 1-2 ml antron reagenst.

2. Redukáló cukrok kimutatása

A cukrok aldehid vagy keton csoportja különböző reagensekkel oxidálható. Cu(II) -sók és aldehid vagy keton csoport redox reakcióján alapul a Fehling-, a Benedict- és a Barfoed-próba. A reakciókban vörös színű Cu_2O csapadék keletkezik.

a.) Benedict próba

A redukáló cukor Cu(II) -citrátból Na_2CO_3 jelenlétében vörös Cu_2O -ot választ le.

Feladat:

5 ml Benedict-reagenshez adjunk 8 csepp 1 %-os glükóz oldatot, rázzuk össze, melegítsük meg, majd hűtsük le. Ismételjük meg a reakciót szacharózzal és keményítővel.

b.) Fehling próba

A redukáló cukor a sötétkék Cu(II)-komplexből lúgos közegben Cu₂O-ot választ le.

Feladat:

3 ml 1 %-os glükóz oldathoz adjunk 3 ml Fehling I és Fehling II 1:1 keveréket, rázzuk össze és forraljuk fel. Ismételjük meg a reakciót maltózzal és szacharózzal.

c.) Barfoed próba

Alkalmas a mono- és diszacharidok megkülönböztetésére a Cu₂O csapadék képződési sebességének alapján. Ecetsavas Cu(II)-acetátból a diszacharidok lassabban választják le a Cu₂O-ot mint a monoszacharidok.

Feladat:

3-3 ml Barfoed reagenshez adjunk 2-2 ml 1 %-os glükóz, szacharóz és keményítő oldatot, rázzuk össze a kémcsöveket és melegítsük forró vízfürdőn 5 percig. Figyeljük meg melyik cukor adott pozitív reakciót. Folytassuk a melegítést kb. 10 percig, figyelve a további reakciókat.

3.) Maltóz, szacharóz hidrolízise

Savas kezelés hatására a diszacharidok glikozidos kötése felhasad, monoszacharidok képződnek.

Feladat:

10 ml maltóz oldatot és 2 csepp cc. H₂SO₄-at melegítsünk kémcsőben 3 percig. Lehűtés után semlegesítsük telített Na₂CO₃ oldattal, indikátor papír segítségével. Az oldat 1-1 ml-ével végezzük el a Fehling- és Seliwanoff-reakciót.

A hidrolízist és a színreakciókat végezzük el szacharózzal is.

4.) Poliszacharidok kimutatása

Egyes poliszacharidok, mint az amilóz, amilopektin, glikogén, jellegzetes színes komplexet képeznek KI-os jód-oldattal.

A keményítő amilózból és amilopektinből áll, a jódkeményítő intenzív kék színéért az amilóz felelős. Az amilóz lineáris α-D-glükópiranóz láncai hélixet képeznek, 6 glükóz molekulát tartalmazva fordulatunként. A hélix belsejébe be tud illeszkedni egy jód molekula, ez az abszorpciós komplex adja a kék színt. Melegítés hatására a kék szín eltűnik, lehűtve újra megjelenik.

A láncágazást tartalmazó poliszacharidok (amilopektin, glikogén) nem képeznek olyan készségesen lineáris hélixet, ezért kevésbé intenzív színnel adják a jód-komplexet.

Eszközök: kémcsövek, kémcsőállvány, kémcsőfogó
pipetták, szemcseppentő, üveglap, üvegbot
vízfürdő

Anyagok: KI-os jód oldat
1 %-os keményítő-oldat

Feladat:

2-3 ml keményítő oldathoz adjunk néhány csepp jód oldatot. Intenzív kék szín jelenik meg. Melegítsük fel, majd hűtsük le az oldatot. Figyeljük meg a színváltozást.

a.) Keményítő savas hidrolízise

Savas hidrolízis során a keményítőből glükóz képződik.

Feladat:

Tegyünk 10 ml 1 %-os keményítő oldatot főzőpohárba, adjunk hozzá 2 ml 20 %-os H_2SO_4 -at, és forraljuk 10 percig. Az elpárolgó vizet forró desztillált vízzel pótoljuk. Lehűtés után semlegesítsük 10 %-os NaOH oldattal a hidrolizátumot és végezzük el a Fehling-próbát. Végezzük el a Fehling-próbát az eredeti keményítő oldattal is.

b.) Keményítő enzimatis hidrolízise

A nyálban levő α -amiláz hatására a keményítő főleg diszacharidokra, maltózra hidrolizál. A nyál az amilázon kívül kis mennyiségű maltázt is tartalmaz, amely a maltózt glükózra bontja.

Feladat:

Üveglemezre, amely alá fehér papírt helyeztünk, csepegtessünk néhány csepp KI-os jód-oldatot úgy, hogy a cseppek ne érintkezzenek egymással.

Kémcsőbe 5 ml keményítő oldathoz 3 ml desztillált vizet adunk (kontrol oldat). Egy másik kémcsőbe 5 ml keményítő oldathoz 3 ml nyálat adunk. A kémcsövek tartalmát összerázzuk és 37 °C-os vízfürdőbe állítjuk. Percenként üvegbottal mindkét kémcsőből egy-egy csepp folyadékot viszünk át egy-egy jódcsepre. Az amilázt tartalmazó kémcsőből vett csepp reakciója hamarosan vörösbarna, majd színtelen lesz. Ekkor abbahagyjuk a mintavételt. A kontrolból vett próba végig kék színt ad. A kontrol kémcső tartalma mindvégig opaleszkál, a nyálat tartalmazó oldatban az opaleszcencia eltűnik.

Mindkét kémcsőből vegyünk ki 1-1 ml-t az inkubálás után és végezzük el a Fehling reakciót. Adjunk az oldatokhoz 2 ml Fehling-reagenst (Fehling I és Fehling II 1:1 keveréke) és melegítsük meg. A nyál nélküli keményítő oldattal a reakció negatív a hidrolizált oldattal pozitív.

II. Szénhidrátok mennyiségi meghatározása

<u>Eszközök:</u>	kés üveglap dörzsmozsár mérőhenger Erlenmeyer lombik (250 ml) mérőlombik (100, 250 ml) pipetta (1,2,5,10,20,25 ml) vízfürdő centrifuga Somogyi kémcsövek rázógép fotométer
<u>Anyagok:</u>	növényi minta (alma vagy körte) kvarchomok 10 %-os TCA (triklórecetsav) Somogyi A, Somogyi B, Nelson C oldatok glükóz törzsoldat (10mg/100ml)

Feladatok:

1. Növényi kivonat készítés

A vizsgálandó növényi anyagból mérjünk le 20 g-ot, vágjuk apróra és dörzsmozsárban kvarchomok segítségével dörzsöljük el. Desztillált vízzel (100-150 ml) mossuk át egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba. A lombikot tartsuk fél óráig vízfürdőben, közben gyakran rázogassuk. Ezután hűtsük le és redős szűrőpapíron szűrjük át egy 250 ml-es mérőlombikba. A szűrőpapíron lévő anyagot kevés desztillált vízzel mossuk át, majd az oldatot egészítsük ki 250 ml-re.

A cukormeghatározás előtt az oldatból el kell távolítani a fehérjét. A fehérjeeltávolítást úgy végezzük, hogy a vizes oldatból 25 ml-t egy 100 ml-es mérőlombikba pipetázunk, hozzáadunk 5 ml 10 %-os TCA-oldatot és a lombikot jelig töltjük desztillált vízzel. A TCA hatására a fehérjék kicsapódnak. A csapadék eltávolítását centrifugálással végezzük (10 perc, 5000 fordulatszám) és a felülúszóból határozzuk meg a cukortartalmat.

2. Redukáló cukrok meghatározása Somogyi-Nelson módszerrel

A meghatározás elve az, hogy a redukáló cukrok a lúgos Cu(II) komplexet redukálják, és belőle Cu₂O-ot választanak ki. A keletkezett Cu₂O-ot foszfor vagy arsenomolibdát reagensben oldjuk, miközben a molibdát komplexet a Cu⁺ ionok molibdénkékké redukálják. Az oldat színintenzitását fotometriásan (730 nm) mérjük. Az arsenomolibdát előnyösebben alkalmazható, mert a kialakult szín stabilabb és az eredmények reprodukálhatóbbak.

<u>Reagensek:</u>	Somogyi A Somogyi B Nelson C
-------------------	------------------------------------

A meghatározás menete: 0,1 vagy 0,5ml vizsgálandó oldathoz 1 ml A+B keveréket (25 ml A + 1 ml B) adunk. (Ezt a reagenst mindig frissen készítjük). A keveréket 20 percig forró vízfürdön tartjuk. Lehülés után 1 ml Nelson C hozzáadásával feloldjuk a kivált Cu_2O -t, összerázzuk és a térfogatot 25 ml-re egészítjük ki. Az összehasonlító oldat 1 ml desztillált vízzel készül és a mintához hasonló módon kezeljük.

A méréshez kalibrációs görbét készítünk glükóz oldat felhasználásával. A 10 mg/100 ml koncentrációjú glükóz oldatból 0,1 , 0,2 , 0,4 , 0,6 , 0,8 és 1,0 ml-t pipetázunk ki Somogyi (30 ml-es) kémcsövekbe, majd egyenként 1,0 ml-re egészítjük ki a térfogatokat desztillált vízzel. A sorozat glükóztartalma így 10, 20, 40, 60, 80, 100 μg lesz. Hozzáadjuk a Somogyi-Nelson reagenseket az előbbiek szerint leírt módon és sorrendben, majd leolvassuk az abszorbancia értékeket.

A kalibrációs görbe felhasználásával számoljuk ki a gyümölcsök cukortartalmát %-ban!

III. Cukrok vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálata

A szénhidrátkémiában alkalmazott vékonyréteg: alumínium hordozólemezen elhelyezkedő szilikagél elválasztó réteg (álló fázis). Kromatográfia alkalmával az oldatban lévő elválasztandó anyagot pont alakjában visszük fel (start). A lemezt ezután alkalmas futtatószer (mozgófázis) tartalmazó zárt edénybe helyezzük, ahol a kapilláris hatás következtében anyagvándorlás és a komponensek elválása következik be. A színtelen cukrokat utólag tehetjük láthatóvá (előhívás): A rétegre reagenst porlasztunk, ami a cukorral színes foltot ad.

A vékonyréteg-kromatográfiában az adszorpció és a megoszlás szabályai érvényesülnek. A cukrok megkötődnek a szilikagél álló fázison és az oldószer hatására polaritásuktól függően vándorolnak fel: a polárosabb vegyületek lassabban, kevésbé polárosak gyorsabban. A vékonyréteg-kromatogramot az R_f értékkel jellemezhetjük, ezen az anyag futási távolságának (startpont-foltközéppont, l) és az oldószer által megtett útnak (t) a hányadosát értjük.

$$R_f = \frac{l}{t},$$

$$R_f \leq 1$$

Az R_f -érték adott álló- és mozgófázisok estén az anyagi minőségre jellemző állandó.

<u>Eszközök:</u>	kapilláris vékonyréteg futtatókád
<u>Anyagok:</u>	cukoroldatok növényi extraktum futtatószer előhívószer

Feladat:

A gyakorlatban sikeresen alkalmazzák szénhidrátok kimutatására a szilikagél rétegen történő futtatást kloroform : metanol : víz = 8 : 5 : 1 elegyben.

Az elválasztandó cukormintákat (növényi extraktum) és a standard cukrokat kihúzott kapillárisokkal külön-külön cseppentjük a lemezen ceruzával finoman megjelölt startvonalra. A mintákat pontszerűen cseppentjük fel, a foltokat hajszárítóval szárítjuk meg. A réteget az oldószerleggyet tartalmazó futtatókádba helyezzük. Az oldószer szintje a startpontoknál kb. fél cm-rel alacsonyabb legyen. A futtatást addig végezzük míg az oldószerfront a lemez felső végét 1 cm-re meg nem közelíti. A réteget a kádból kiemeljük, hajszárítóval megszáritjuk, fülke alatt óvatosan lepermetezzük cc. H_2SO_4 :víz = 1:1 elegyével és szárítószekrényben 100 °C-on szárítjuk 5 percig. A kromatogramon figyeljük meg a foltok helyét és intenzitáskülönbségét. Számítsuk ki az egyes cukrok R_f értékeit. (Celofánnal beburkolva a lemezt beragaszthatjuk a jegyzőkönyvbe.)

IV. Szacharóz savas és enzimes hidrolízisének tanulmányozása polarimetrián

A szacharóz nem redukáló diszacharid. Híg ásványi savval vagy enzimatikusan könnyen hidrolizálható, s közben ekvimoláris mennyiségű D-glükózra és D-fruktózra esik szét. A hidrolízis jól követhető az oldat forgatóképességének megfigyelésével. A forgatóképesség a hidrolízis során a következőképpen változik: az oldat jobbra forgatása folytonosan csökken, eléri a 0 értéket, majd balra forgatóvá válik és az oldat forgatóképessége a teljes hidrolízis bekövetkezéséig folytonosan nő. A forgatóképesség előjelének megváltozása miatt a szacharóz hidrolízisét invertálásnak is nevezik.

A gyakorlaton a szacharóz oldat forgatóképességének változását mérjük híg kénsav, valamint invertáz enzim hatására bekövetkező hidrolízis során.

Eszközök: polariméter
kémcső
pipetta

Anyagok: 2 %-os szacharóz oldat
cc. H_2SO_4
telített Na_2CO_3
invertáz oldat

Feladatok:

1. Mérjük meg a 2 %-os szacharóz oldat forgatóképességét, majd 1 ml-éhez adjunk 1 csepp invertáz oldatot. Pipetázzuk az oldatot a polarimétercsőbe és olvassuk le a forgatás szögét percenként. Számoljuk ki a fajlagos forgatóképesség értékeket és magyarázzuk meg az észlelt jelenséget.
2. Egy kémcsőbe 10 ml 2 %-os szacharóz oldathoz adjunk 2 csepp cc. H_2SO_4 -t és melegítsük 3 percig. Neutralizáljuk telített Na_2CO_3 oldattal, majd mérjük meg a forgatás szögét. Számoljuk ki a fajlagos forgatóképességet.

3. Egy kémcsőbe 10 ml 2 %-os szacharóz oldathoz adjunk 2 csepp cc. H_2SO_4 -t.

Helyezzük az oldat 1 ml-ét polarimétercsőbe, melynek hossza 10 cm. Termosztáljuk a polarimetriás küvetát 60°C -ra. Olvassuk le az elforgatás szögét 20-30 percenként.

Számoljuk ki a fajlagos forgatóképesség értékeit és magyarázzuk meg az észlelt jelenséget.

V. Monoszacharidok alditol-acetátjainak előállítása és gázkromatográfiás elválasztása

A poliszacharidok szerkezetvizsgálata során az első kérdés annak megállapítása, hogy milyen monomerekből épül fel a vizsgált poliszacharid. A poliszacharidokat felépítő monoszacharidok elválasztása és azonosítása történhet vékonyréteg -vagy gázkromatográfiás módszerrel a poliszacharid hidrolízisét követően.

A gyakorlaton alkalmazott eljárás magába foglalja a poliszacharid savas hidrolízise után nyert monoszacharidok átalakítását a megfelelő alditol-acetátokká, amelyeket azután gázkromatográfiásan elemzünk. Azért, hogy az azonosítást zavaró gyűrű izomerek és anomerek eltűnjenek, redukcióval a cukrokat cukoralkoholokká (alditolokká) redukáljuk. Így pl. a D-glükóz esetében, amely α , β , piranóz és furanóz formában fordul elő, a redukció egyetlen cukoralkoholt (alditolt) eredményez, ez a D-glucit vagy D-szorbit. Egy többféle monoszacharidból felépülő poliszacharid esetében igen bonyolult lenne a gázkromatográfiás profil redukció nélkül. Ha pl. egy poliszacharid hidrolízisekor 4 különféle cukor keletkezik, akkor a 4 monomer elválasztása 16 csúcsot eredményezne, ami az azonosításukat lehetetlenné tenné. Ellenben a redukció után csak 4 alditol-acetát van jelen.

A redukció NaBH_4 -del lúgos pH-n történik. A borohidrid feleslegét tömény ecetsav cseppenkénti hozzáadásával bontjuk el, majd a képződött borátot metanollal történő ismételt bepárlással távolítjuk el. Az acetilezést ecetsavanhidriddel hajtjuk végre.

A gyakorlaton a hallgatók a poliszacharid trifluorecetsavas hidrolizátumát a laboratóriumi aszisztentstől kapják meg. Az azonosításhoz standard cukrok állnak rendelkezésre.

Eszközök: 100 ml-es csiszolatos gömblombikok
mérőhengerek
pH-papír
Pasteur pipetták
rázótolcsér
ROTAVAPOR bepárló berendezés
gázkromatográf

Anyagok: poliszacharid hidrolizátum
cukor standardok (Xyl, Rha, Ara, Glc, Gal)
 NaBH_4
ecetsav
metanol
ecetsavanhidrid
toluol
kloroform



Feladat:

1. Mintaelőkészítés:

A poliszacharid hidrolizátumot és a standard cukrok néhány mg-ját feloldjuk 5 ml desztillált vízben és 10 mg NaBH_4 -t adunk hozzá. 2 óra múlva ecetsavval lesemlegesítjük és vákumban szárazra pároljuk. Majd 3 ml metanol és 2 ml ecetsav hozzáadása után bepároljuk. Ezt a lépést kétszer megismételjük, majd háromszor 3 ml metanollal ismételtén bekonzentráljuk.

Acetilezésre 5 ml ecetsavanhidridet és piridint vagy etilacetátot használunk, a lombikot bedugjuk és 1 órára forró vízfürdőbe helyezzük. Ezután szárazra pároljuk, majd háromszor 3 ml toluollal vákumban bepároljuk. A maradékot oldjuk 4 ml kloroformban, átvisszük rázóüvegsérbe és mossuk 4 ml desztillált vízzel háromszor. A kloroformos fázist Na_2SO_4 fölött megszáritjuk, majd kis térfogatra bepároljuk és gázkromatográfiásan analizáljuk.

2. Gázkromatográfiás meghatározás:

Készülék: HP 5830 A Gázkromatográf

Kolonna: HP 101 vagy SP 2380 típusú kapilláris kolonna

Detektor: FID

Vivőgáz: nitrogén

Injektor hőmérséklet: 250 °C

Detektor hőmérséklet: 300 °C

Hőfokprogram: Kezdeti hőmérséklet: 180°C 1 percig

Fűtési sebesség: 2°C/perc

Végő hőmérséklet: 230°C 5 percig

Összehasonlító oldat: standard cukrok alditol-acetátjai

Minta oldat: a minta előkészítésében leírtak szerint

Elemzés: A gázkromatográfiás paraméterek beállítása után először az összehasonlító, majd a minta oldatokat elemezzük. A retenciós idők alapján azonosítjuk a minta cukor komponenseit.

VI. Glükóz, fruktóz és szacharóz, laktóz meghatározása természetes eredetű anyagokból folyadékkromatográfiás (HPLC) és vékonyrétegekromatográfiás (VRK) módszerrel

A természetben nagyobb mennyiségben csak glükóz és a fruktóz fordul elő a monoszacharidok közül szabad állapotban. A két leggyakoribb diszacharid a szacharóz (répacukor, nádcukor) amely glükózból és fruktózból, és a laktóz (tejcukor) amely glükózból és galaktózból épül fel. A gyakorlaton ezen cukrok meghatározását végezzük el természetes anyagokból vékonyrétegekromatográfiás és folyadékkromatográfiás módszerrel.

Eszközök: nagynyomású folyadékkromatográf
Merck Kieselgel réteg
kémcsövek
pipetták, mikrofecskendő vagy kapillárisok
mérőlombik
szűrők

Anyagok: fruktóz, glükóz, galaktóz, laktóz, maltóz, szacharóz
méz, gyümölcslé, tej, tejpor
dializált vas oldat
cc. H₂SO₄
difenilamin-anilin reagens
1 M ecetsav oldat

Feladatok:

Folyadékkromatográfiás meghatározás:

Detektor: RI

Integrátor: HP 3385

Kolonna: Chrompack LiChrosorb 10 NH₂ 250 mm x 4.6 mm

Eluens: MeCN : víz : ecetsav / 90 : 10 : 0.1

Az eluenst elegyítés után 0.45 µm-es szűrőn vákuum alkalmazásával átszűrjük.

Áramlási sebesség: 2 ml/perc

Összehasonlító oldatok: glükóz, fruktóz, szacharóz, laktóz összehasonlító anyagból külön-külön 10 mg/ml-es vizes oldatot készítünk. Az oldatokból 1 - 1 ml-t egy kémcsőbe pipettázunk. Ezt az oldatot használjuk összehasonlító oldatként.

Minta oldatok:

1.) Mézből pontos beméréssel 1 g/10 ml-es vizes oldatot készítünk.

2.) Üzletben vásárolható rostos gyümölcslevet 0.45 µm-es szűrőn átszűrünk. Az első injektálás után, ha szükséges, vízzel megfelelő mértékben hígítjuk.

3.) 10 ml forralt tejet 100 ml-es mérőlombikba pipettázunk. 50 ml desztillált vizet és 1 ml 1 M ecetsav oldatot adunk hozzá, majd jól összerázzuk. 4 ml dializált vas oldatot adunk hozzá, majd vízzel 100 ml-re töltjük és összerázzuk. A szuszpenziót redős szűrőn szűrjük, hogy a kicsapódott fehérjéket eltávolítsuk. A szűrletet használjuk a HPLC-s és a VRK-s elemzéshez.

4.) Milk Quick tejporból 0.3 g-ot bemérünk 5 ml-es mérőlombikba. Vízzel feltöltjük. HPLC-s vizsgálatához az oldatot 0.45 µm-es szűrőn szűrjük.

Vékonyrétegkromatográfiás meghatározás

Réteg: Kieselgel 60 F₂₅₄ 5554 Merck készréteg

Eluens: Etilacetát : i-Propanol : víz : piridin = 26 : 14 : 7 : 2

Összehasonlító anyagok: mint a HPLC-s meghatározásnál

Minta oldatok: mint a HPLC-s meghatározásnál

Felvitt anyagmennyiség: 0.5 µl

Kifejlesztési idő: kb. 45 perc

Előhívó: difenilamin-anilin reagens

cc. H₂SO₄

A lemezt futtatás után megszáritjuk, előhívóval lepermetezzük, majd 100 °C-on kb. 5 percig, a foltok megjelenéséig melegítjük.

VII. C-vitamin meghatározása

A C-vitamin vagy L-aszkorbinsav kémiai szempontból egy diénol csoportot tartalmazó lakton. Erősen redukáló hatású vegyület, hidrogén leadásával dehidro-L-aszkorbinsavvá oxidálódik. A reakció reverzibilis, így a C-vitamin a sejtekben redoxifolyamatokban is részt vesz. Elterjedt a növényi és állati szervezetekben. Az emberi szervezet nem tudja szintetizálni, ezért naponta 80-100 mg C-vitamin felvétele szükséges. Legfontosabb C-vitamin forrásaink a növények (csipkebogyó, paprika, káposzta, citrom stb.). A C-vitamin hiánya skorbutot okoz.

A C-vitamin meghatározásához redukáló tulajdonságát használjuk fel. Így a hozzáadott Fe(III) ionokból ekvivalens mennyiségű Fe(II)ionok keletkeznek, melyek színes komplexet képeznek az α,α-dipiridil reagenssel. Ily módon a C-vitamin mennyisége fotometriásan meghatározható.

Ahhoz, hogy a valódi aszkorbinsav tartalmat kiszámíthassuk, meg kell határoznunk a látszólagos aszkorbinsav tartalmat és a reduktonok mennyiségét.

Eszközök: porcelán tálkák
mérőlombikok(100 ml-es)
Erlenmeyer lombikok
centrifugacsövek
vízfürdő
pipetták
tölcsér
mérleg
fotométer

Anyagok: növényi minták
jégecet
10 %-os foszforsav
α,α-dipiridil reagens
10%-os FeCl₃
5 %-os ammónium acetát
4%-os triklórecetsav

Feladatok:

1. A vizsgálandó minta előkészítése:

A vizsgálandó mintákból 5-5 g-ot porcelán tálakba mérünk és az aszkorbinsav konzerválására hozzáadunk 1ml jégecetet . Péppé dörzsöljük, majd 100 ml-es mérőlombikba

mossuk és desztillált vízzel jelig töltjük. Az elkészített és összerázott oldatból 50 ml-t kettős redősszűrőn 100 ml-es Erlenmeyer lombikba szűrünk, majd az oldatokat 15 percig centrifugáljuk. A felülúszókat ismét szűrjük kettős redősszűrőn és így tiszta, világossárga oldatokat nyerünk a további vizsgálatokhoz.

2. Látszólagos aszkorbinsav-tartalom meghatározása:

Egy 100-ml-es mérőlombikba a következő oldatokat adagoljuk az alábbi sorrendben: 10 ml ecetsavas kivonat, 10 ml desztillált víz, 3 ml 10 %-os foszforsav (az oldat pH-ja 1,7 legyen), 2,5 ml α,α -dipiridil reagens, 1 ml FeCl_3 oldat. A lombik tartalmát minden egyes reagens hozzáadása után alaposan összerázzuk és ezután sötét helyen 30 percig állni hagyjuk. 30 perc után a lombikok tartalmát desztillált vízzel 100 ml-re kiegészítjük és összerázás után 496 nm hullámhossznál fotometráljuk. A kapott abszorbancia értéket felírjuk. Összehasonlító oldatként a vizsgálandó mintát és valamennyi reagenst, az α,α -dipiridil kivételével, egy másik 100 ml-es mérőlombikba adagoljuk és desztillált vízzel jelig töltjük.

Az eredményt a következő képlettel számoljuk:

$$I = \frac{A \cdot 1119 \cdot 10}{k \cdot v \cdot s}$$

I	= látszólagos aszkorbinsav tartalom (mg/100 g)
A	= mért abszorbancia
1119	= abszorbancia faktor
k	= kuvetta vastagsága (cm)
v	= színreakcióra felhasznált oldat mennyisége (ml)
s	= bemért anyag mennyisége (g)

3. Reduktonok meghatározása:

2 ml ecetsavas növényi kivonatot mérjünk be egy 100 ml-es mérőlombikba, adjunk hozzá 10 ml desztillált vizet és az oldat pH-ját állítsuk 6-ra 5 %-os ammónium-acetát oldattal (kb. 5 ml). Állítsuk a lombikot 50 °C-os vízfürdőbe 30 percre. 30 perc letelte után adjunk a lombik tartalmához 30 ml desztillált vizet, hűtsük le, majd lehűlés után adjunk hozzá 20 ml 4 %-os triklórecetsav oldatot.

Ezután a következő reagenseket mérjük a lombikba a megadott sorrendben:

2,5 ml 10 %-os foszforsav-oldatot
 2,5 ml α,α -dipiridil reagens
 1 ml FeCl_3 oldat

A lombik tartalmát minden egyes reagens hozzáadása után alaposan összerázzuk és utána sötét helyen 30 percig állni hagyjuk. 30 perc után desztillált vízzel a lombikot jelig töltjük, összerázzuk és összehasonlító oldattal szemben 496 nm hullámhossznál fotometráljuk. Az összehasonlító oldat a minta oldattal azonos módon készül α,α -dipiridil nélkül.

Az eredményt az alábbi képlettel számítjuk ki:

$$II = \frac{A \cdot 1119 \cdot 10_2}{k \cdot v \cdot s}$$

II = redukontartalom
 A = mért abszorbania
 k, v, s = azonos a látszólagos aszkorbinsav-tartalomnál megadottakkal.

4. A valódi aszkorbinsav-tartalom számítása:

A valódi aszkorbinsav mennyiségét a következőképpen számítjuk ki:

Aszkorbinsav (mg/100 g) = I - II

I = látszólagos aszkorbinsav-tartalom
 II = a reduktonok mennyisége

VIII. Aszkorbinsav meghatározás 2,6-diklórfenol-indofenol (DCIP) oldattal

A C-vitamin vagy L-aszkorbinsav kémiai szempontból egy dienol csoportot tartalmazó lakton. Erősen redukáló hatású vegyület, hidrogén leadásával dehidro-L- aszkorbinsavvá oxidálódik. A reakció reverzibilis, így a C-vitamin a sejtben redoxi folyamatokban is részt vesz. Elterjedt a növényi és állati szervezetekben. Az emberi szervezet nem tudja szintetizálni, ezért naponta 80-100 mg C-vitamin felvétele szükséges. Legfontosabb C-vitamin forrásaink a növények (csipkebogyó, paprika, káposzta, citrom stb.). A C-vitamin hiánya skorbutot okoz. A C-vitamin meghatározásához redukáló tulajdonságát használjuk fel.

Eszközök: büretta
 mérőlombikok(100 ml-es)
 Erlenmeyer lombikok
 pipetták
 tölcsér
 mérleg

Anyagok: növényi minták
 C vitamin tabletta
 1 %-os oxálsav oldat
 DCIP oldat
 foszfát puffer

Feladatok:

DCIP oldat:

1 ml oldat 0,3 mg aszkorbinsavat mér. 457 mg DCIP-t oldunk 980 ml vízben majd hozzáadunk 20 ml foszfát puffert, aminek 100 ml-éhez 330 mg K_2HPO_4 és 405 mg KH_2PO_4 kell. Kék színű, néhány napig stabil.

Minta oldatok:

Citromlé, narancslé, grape-fruit lé, lehet frissen facsart, vagy dobozos, esetleg vitaminozott.

200 ml oldatot leszűrünk a rostoktól. 20 ml szűrt levét 100 ml-re hígítunk 1% oxálsav oldattal.

Összetört C vitamin tablettából 250 mg C vitaminnak megfelelő mennyiséget oldunk 1 %-os oxálsavban, 250 ml-re feltöltjük.

Mérés kivitelezése:

1-5 ml DCIP oldatot titrálunk a gyümölcslével, vagy a vitamin oldattal. Az oldat először rózsaszín lesz, majd színtelen az átcsapáskor.

Hoches C különféle gyümölcslevek ötszörösére hígítva

C vitamin tabletta, mg/ml vizes oldat

Szűrt narancslé ötszörösére hígítva

Citrom kifacsart leve ötszörösére hígítva

Minta	Fogyott oldatra	ml	x	ml	DCIP Aszkorbinsav tartalom	Kiindulási tartalma	anyag	C	vitamin

Számítsák ki az adott mintának mennyi volt a kiindulási aszkorbinsavtartalma. Vegyék figyelembe a hígítást is!

LIPIDEK VIZSGÁLATA

Lipideknek nevezzük mindazon anyagokat, amelyek bármely biológiai mintából apoláros oldószerekkel extrahálhatók. A lipidek kémiaiilag rendkívül különböző vegyületek. Csoportosításuk egyik lehetősége lúggal való reakciójuk. Ennek alapján megkülönböztetünk elszappanosítható és el nem szappanosítható lipideket. Az elszappanosítás tulajdonképpen hidrolízis, az apoláros vegyületből vízben oldódó, poláros vegyületek keletkeznek. Mindkét csoport további osztályokra tagolódik:

ELSZAPPANOSITHATÓ LIPIDEK: egyszerű lipidek: neutrális zsírok, növényi olajok, viaszok
összetett lipidek: foszfogliceridek, szfingolipidek

EL NEM SZAPPANOSITHATÓ LIPIDEK: terpének, szteroidok, vitaminok, (A,D,E,K), prosztaglandinok

A lipideknek rendkívül fontos szerepe van a sejtmembránok felépítésében.

I. A lipidösszetétel hatása a lipid határfelületi réteg permeabilitására

A membránok lipid összetétele jelentős mértékben befolyásolja a membránok permeabilitását. A jelenség egyszerűen demonstrálható a következő gyakorlattal, melyben lipid határfelületi réteg permeabilitási tulajdonságait vizsgáljuk.

Ha butanolt, melyben különböző lipideket oldottunk, rétegezünk víz fölé, a lipidek a két fázis határán rendezett határfelületi réteget képeznek. Ez a rendezett határfelületi réteg diffúziós gátként működik. Erről legkönnyebben akkor győződhetünk meg, ha a butanolban a lipidek mellett valamilyen élénk színű festéket oldunk, és egy idő múlva összehasonlítjuk a vizes fázisba átdiffundáló festék mennyiségét a lipidet tartalmazó és nem tartalmazó minták esetében.

Eszközök: kémcsövek, állvány
Pasteur pipetta
spektrofotométer
küvetta

Anyagok: zsírsavak (szterarinsav vagy oleinsav)
acilgliceridek (triolein vagy tripalmitin)
foszfolipid (lecitin)
szteroid (koleszterin)
metilénkék tartalmú butanol (0,25 g/l)

Feladat:

A rendelkezésre álló lipidekből 100 mg-ot mérjünk számozott kémcsövekbe. Az első kémcsövet hagyjuk üresen. A lipideket oldjuk fel 3,0 ml metilénkéket tartalmazó butanolban.

A lipidek feloldása után óvatosan rétegezzünk 3,0 ml desztillált vizet a butanol alá. Másfél-két óra múlva óvatosan szívjuk ki a vizes fázist a butanol alól. Az első kémcső vizes fázisának vegyük fel a spektrumát 300-800 nm között, majd mérjük meg a minták abszorbanciáját az abszorpciós maximumnak megfelelő hullámhosszon. A mérési eredményeket hasonlítsuk össze az első kémcső vizes fázisának abszorbanciájával.

II. Neutrális zsírok összetételének vizsgálata

A neutrális zsírok a glicerín zsírsavakkal képzett észterei, lúgos hidrolízisükkor glicerinnre és zsírsavakra bomlanak. Vízelvonószerek hatására a glicerinnből szúrós szagú aldehid, akrolein keletkezik, amely redukáló hatású. A lúgos hidrolízis során felszabaduló zsírsavak metilezés után metilészter formájában gázkromatográfiásan elemezhetők. Zsírsavösszetételük alapján nagy biztonsággal azonosíthatók a növényi olajok, sőt sejtfaluk zsírsavösszetétele alapján még a baktériumok és a gombák is.

Eszközök: kémcsövek, állvány
Bunsen égő
csipesz
szűrőpapír
mikrofecskendő
zárható reakcióedény
gázkromatográf

Anyagok: különböző olaj minák
kálium-hidrogén-szulfát
ammónium-hidroxid
ezüst-nitrát
BF₃-metanol vagy más metilezőszer

Feladatok:

1.Száraz kémcsőbe 1-2 csepp olajhoz késhegynyi kristályos kálium-hidrogén-szulfátot adunk. Óvatosan, majd erősen melegítjük. Jellegzetes szúrós szagú akrolein keletkezik. Ammóniás ezüst-nitrát oldatba mártott szűrőpapírt tartunk a gáztérbe. A papír fém ezüst kiválás folytán megfeketedik.

2.Zsírsav metilészterek meghatározása gázkromatográfiával.

Készülék: HP 5830A gázkromatográf
Kolonna: HP 101, FFAP vagy SP 2330 típusú kapillár kolonna
Detektor: FID
Vivőgáz: nitrogén
Injektor hőmérséklet: 250 °C
Detektor hőmérséklet: 300 °C
Hőfokprogram: Kezdeti hőmérséklet: 100 °C 1 percig
Fűtési sebesség: 10 °C/perc
Végő hőmérséklet: 220 °C 5 percig
Összehasonlító oldat: zsírsav metilészter standard

Minta előkészítés: Valamennyi olaj illetve zsír mintából 50-50 mg-ot mérünk egy-egy reakcióedénybe. Hozzáadjuk a metilező reagenst. A reagens használati utasításában megadott idejű melegítés illetve várakozás után a minta injektálható a gázkromatográfbba.

Elemzés: A gázkromatográfiás paraméterek beállítása után először az összehasonlító, majd a minta oldatokat elemezzük. A retenciós idők alapján azonosítjuk a minta zsírsavkomponenseit. A területszázalékos értékelés alapján összehasonlítjuk a különböző zsír illetve olaj minták zsírsav összetételét. Azonosítjuk az ismeretlen olajat.

III. Illóolajok vizsgálata

Az illóolajok szerkezetileg egymáshoz közelálló vegyületek keverékei, növényekből, virágokból, növényi nedvekből nyerhetők ki. Az illóolajok alkotórészei a terpének, melyek az el nem szappanosítható lipidek csoportjába tartoznak. A monociklikus monoterpének legismertebb képviselője a mentol, amely a borsmenta illóolajában található meg nagyobb mennyiségben. Hűsítő íze és csíráölő hatása miatt a gyógyászatban és a kozmetikában is felhasználják.

Eszközök: futtatókád
vékonyréteg
mikrofecskendő vagy kapilláris
hajszárító

Anyagok: mentol
metanol
borsosmentaolaj
cc. kénsav
kloroform

Feladat:

Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄ 5554 Merck készréteg

Eluens: kloroform : metanol = 1 : 1

Összehasonlító oldat: 1 mg/ml-es metanolos mentol oldat

Minta oldat: 0,1 ml borsosmenta olajat 5 ml metanolban oldunk

Felvitt anyagmennyiség: 1 µl

Értékelés: A felfuttatott lemezt megszáritjuk, majd UV lámpa alatt megnézzük. Ceruzával bejelöljük a foltokat. Ezután a lemezt cc. kénsavval bepermetezzük és a foltok megjelenéséig melegítjük. Kiszámoljuk a mentol R_f értékét.

IV. Lecitin kimutatása tyúktojás sárgájában és margarinban

A lecitin a foszfogliceridek csoportjába tartozó összetett lipid, az állati sejtek membránjának fő alkotórésze. Teljes hidrolízise glicerint, foszforsavat, kolint és zsírsavat

eredményez. A tiszta lecitin fehér, csirízszerű anyag, mely jól oldódik alkoholban, kloroformban, éterben, de nem oldódik acetonban. E tulajdonsága alapján elkülöníthető a többi lipidtől, melyek acetonban is oldódnak.

Mivel egyaránt tartalmaz apoláros, (zsírsavláncok) és poláros (foszforsav, kolin) csoportot, a lecitin amfipatikus sajátságú, ami alkalmassá teszi micellák és lipid kettősrétegek kialakítására. Vízzel stabil emulziót képez, emiatt alkalmazzák az élelmiszeriparban emulgeáló és emulzió stabilizáló szerként.

Eszközök: főzőpohár
üvegbot
vízfürdő
tölcsér
futtatókád
kémcsövek, állvány
mikrofecskendő vagy kapillárisok

Anyagok: tojássárgája
margarin
etanol
aceton
kloroform
metanol
ecetsav
Dragendorf reagens
molibdenát reagens
jód

Feladatok:

1. Kis főzőpohárba egy tojássárgájának kb. harmad részét öntjük, vagy 2 g margarint mérünk. Keverés közben 15 ml forró alkoholt adunk hozzá. A keveréket kihűlés után száraz kémcsőbe szűrjük, a szűrést addig ismételjük, míg teljesen tiszta, átlátszó oldatot kapunk. A szűrlet egy kis részletét használjuk a VRK azonosításhoz.

Száraz kémcsőben 2-3 ml acetonhoz néhány csepp szűrletet csepegtetünk. Mivel a lecitin acetonban nem oldódik, az oldat opálösszessé válik, ami a lecitin kicsapódására utal.

A maradék szűrlethez desztillált vizet csepegtetünk. A lecitin emulgeálódását figyelhetjük meg. Nagyobb mennyiségű tojássárgáját használva a lecitin preparatív mennyiségben is elkülöníthető.

2. Lecitin VRK azonosítása

Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄ 5554 Merck készréteg, 110 °C-on 10 percig aktiválva

Eluens: kloroform : metanol : ecetsav : víz = 25 : 15 : 4 : 2

Összehasonlító oldat: foszfátidil kolin standard 100 mg/ml -es hexános oldat

Minta oldat: Etanolos tojássárga szűrlet, etanolos margarin oldat

Felvitt anyagmennyiség: 5 µl

Három lemezre egymás mellé csepegtetjük a minta és összehasonlító oldatokat. Futtatás után szárítjuk meg a lemezeket, majd minden lemezt más előhívóval permetezzük be.

a.) jó d göz: általános előhívó

- b.) Dragendorff reagens: a kolin tartalmú lipidek narancssárgák
c.) molibdenát reagens: a foszfor tartalmú lipidek kék foltot adnak

V. Koleszterin kimutatása az agyban és disznózsírban

A koleszterin bonyolult szerkezetű, ciklikus szekunder alkohol. Minden emberi és állati sejtben részben szabadon, részben észteresített alakban megtalálható. Különösen sok koleszterin van az agyban, spermában és faggyúban. Az epekövek koleszterin tartalma néha eléri a 90 %-ot.

A koleszterin színreakciói alapján is kimutatható. A gyakorlaton használt színreakció azon alapul, hogy a koleszterin szekunder alkoholcsoportja vízleadás mellett kilép és így színes termék keletkezik

Eszközök: kémcsövek, állvány
porcelánmozsár
10 x 10 cm-es üveglemez
szárítószekrény
kés
pipetta

Anyagok: agy
gipsz
kloroform
cc. kénsav
ecetsavanhidrid

Feladatok:

3-5 g agyat megközelítőleg két rész gipsszel porcelánmozsárban gondosan eldörzsölünk. A sűrű pépet spatulával vékony rétegben üveglemezre kenjük, és szárítószekrényben 40 °C-on szárítjuk. A megszáradt anyagot késsel lekaparjuk, mozsárban szétdörzsöljük, és kémcsőbe öntjük. A nyert porhoz 5-6 ml kloroformot teszünk, és a kémcső tartalmát 5-10 percig rázzuk. Kloroformmal megnedvesített szűrőn át száraz kémcsőbe szűrjük. A szűrlettel elvégezzük a következő próbákat:

1. Szalkovszkij-próba:

2-3 ml szűrlethez 2-3 ml cc. kénsavat öntünk és óvatosan összekeverjük. Figyeljük meg az oldat színváltozását.

2. Lieberman-Burchard reakció:

2-3 ml szűrlethez 10 csepp ecetsavanhidridet és 1-2 csepp cc. kénsavat adunk. Jól összekeverjük és megfigyeljük a jelentkező színt.

3. Kimutatás vékonyrétegekromatográfiával:

Eszközök: 200 ml-es gömblombik
visszafolyó hűtő
mérőhenger
pipetta
rázótölcsér
100 ml-es gömblombik
olajfürdő
rezsó
futtatókád
szilikagél réteg

Anyagok: disznózsír
vaj
20 %-os kálium-hidroxid alkoholos oldata
hexán
éter
ecetsav
benzol
koleszterin oldat
ecetsavanhidrid
cc. kénsav

A vizsgálati anyagból 5 g-ot mérünk a 200 ml-es gömblombikba, és 25 ml 20 %-os alkoholos kálium-hidroxid oldatot adunk hozzá. Néhány forrkövet dobunk bele. A lombikra visszafolyó hűtőt szerelünk és a lombikot olajfürdőbe merítjük, majd egy órán át egyenletesen forraljuk. Ekkor az olajban levő elszappanosítható zsírok elhidrolizálnak. A lombik tartalmát a forralás befejeztével lehűtjük, majd a rázótölcsérbe töltjük és a lombikot annyi desztillált vízzel öblítjük át, hogy a folyadék összterfoglata kb. 100 ml legyen. A rázótölcsérben levő folyadékot 70 ml hexánnal egy percig erőteljesen rázzuk, majd a hexán teljes elválásáig állni hagyjuk. Az elválást tökéletessé tehetjük néhány ml alkoholos kálium-hidroxid oldat hozzáadásával. Az alsó fázist a rázótölcsérből leengedjük, ez tartalmazza a képződött szappan oldatot. A felső fázist a 100 ml-es gömblombikba engedjük, és csökkentett nyomáson szárazra pároljuk. Ez a maradék tartalmazza az el nem szappanosítható lipidokat. A maradékot 2 ml benzolban oldjuk és rétegekromatográfiásan vizsgáljuk.

Réteg: szilikagél 60 F 254 5554 Merck készréteg

Eluens: hexán : éter : ecetsav = 70 : 30 : 30

Összehasonlító oldat: koleszterin standard oldat

Minta oldat: el nem szappanosítható rész benzolos oldata

Előhívó: ecetsavanhidrid : kénsav = 10 : 1

Értékelés: A megfuttatott lemezt megszáritjuk, az előhívószerral bepermetezzük. A koleszterin feltja az előhívószér hatására kék színnel jelenik meg, majd 100 °C-on néhány perc múlva piros színû lesz.

VI. A-vitamin kimutatása sárgarépában és csukamájolajban

A kimutatás lényege, hogy az A vitamin és a karotinok oxidációs termékei mint a xantofill és más karotinoidok pozitív reakciót adnak antimon-trikloriddal (kék színeződés). Néhány lipid jelenléte, valamint víznyomok zavarják a reakciót.

Eszközök: kémcsövek, állvány
Pasteur pipetta
reszelő
dörzsmozsár
rázótolcsér
Erlenmeyer lombik
szűrőpapír

Anyagok: csukamájolaj
sárgarépa
kloroform
kloroformos antimon-triklorid oldat
kvarchomok
vízmentes nátrium-szulfát
5 %-os alkoholos kálium-hidroxid oldat

Feladatok:

1. Tiszta száraz kémcsőbe néhány csepp csukamájolajat öntünk. Hozzáadunk 1 ml kloroformot, majd 1 ml kloroformos antimon-triklorid oldatot. Kék színeződést tapasztalunk.

2. A sárgarépát megreszeljük és kb. 1 g-ot kis dörzsmozsárban kvarchomokkal és 5 ml 5 % -os alkoholos kálium-hidroxid oldattal eldörzsölünk. Pár perc várakozás után a pépről óvatosan leöntjük a kivonatot és rázótolcsérben 5 ml száraz kloroformmal néhányszor összerázzuk. Mikor a festékanyag átoldódott a kloroformba és a két réteg szétvált, az alsó kloroformos fázist vízmentes nátrium-szulfátot tartalmazó tolcséren át 25 ml-es száraz Erlenmeyer lombikba engedjük. A kloroformos szűrlet néhány ml-ét szűrőpapírra csepegtetjük. A foltra kloroformos antimon-triklorid oldatot öntünk. Kék színeződést tapasztalunk.

NUKLEINSAVAK VIZSGÁLATA

I. Nukleinsavak hidrolízise

A dezoxiribonukleinsavak (DNS) és a ribonukleinsavak (RNS) a genetikai információ tárolására és továbbítására szolgáló makromolekulák. A sejtekben bázikus tulajdonságú fehérjékkel kapcsolódva (nukleoproteinek) fordulnak elő. A vizsgálati anyagból fenollal vagy neutrális sóoldattal kivonhatók és az extrahált nukleinsav alkoholos kicsapással tisztítható. Hidrolízisük során nitrogéntartalmú bázisok, ötszénatomos cukrok és foszforsav keletkeznek. A polinukleotid lánc felbontása savas vagy lúgos hidrolízissel végezhető el. Különbséget tapasztalunk azonban az RNS és a DNS hidrolízise között: a DNS lúgos hidrolízissel szemben ellenálló, szemben az RNS-sel amely nukleozidra és foszforsavra esik szét. Savas hidrolízissel viszont mindkét nukleinsavféleség nukleobázisra, cukorra és foszforsavra bomlik. Az egyes komponensek kimutatásához nem szükséges izolálni a nukleinsavakat, azok a savas hidrolizátumból közvetlenül kimutathatók. A gyakorlaton élesztőt hidrolizálunk savval és lúggal és vizsgáljuk a hidrolízis termékeit.

Eszközök:

- dörzsmozsár
- csiszolatos gömblombik (250 ml-es)
- visszafolyóhűtő
- fogók
- Bunsen-égő, azbeszt háló, vasháromláb
- szivatópalack
- nuccsszűrő, szűrőpapír
- pipetták
- kémcső, kémcsőállvány
- Erlenmeyer lombik (200 ml-es)
- mérőhenger
- szemcseppentő
- vízfürdő

Anyagok:

- élesztő (szárított is lehet)
- kvarchomok
- 1M H_2SO_4
- forrkő
- 10 %-os NaOH
- Fehling I. oldat
- Fehling II. oldat
- cc. NH_4OH
- 3 %-os AgNO_3
- $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$
- indikátorpapír
- 0,2 %-os NaOH
- 0,5 %-os CuSO_4

1. Az élesztő közvetlen savas hidrolízise

Feladat:

Visszafolyó hűtővel ellátott gömblombikban 5 g friss élesztőt 30 ml 1 M H_2SO_4 -ban 1 órán keresztül forralunk. A nukleoproteinek fehérjekomponense részben, a nukleinsavkomponense csaknem teljesen hidrolizál purin- illetve primidinbázisokra, ribózra illetve dezoxiribózra és foszforsavra. A hidrolizátumban ezek a komponensek kimutathatók:

A pentózt Bial próbával mutatjuk ki 10 %-os NaOH-dal való semlegesítés után. A bázisok kimutatásához 2 ml hidrolizátumot 10 %-os NH_4OH -dal meglúgosítunk és néhány csepp 3 %-os AgNO_3 oldatot adunk hozzá. Rövid időn belül a bázisok ezüstsói barnás színű, pelyhes csapadék formájában válnak ki.

A foszforsavat NH_4OH -dal történő semlegesítés után mutatjuk ki. 2 ml hidrolizátumhoz néhány csepp ammónium -hidroxidot adunk, majd az oldatot salétromsavval visszاسavanyítjuk (a semlegesítést és a savanyítást indikátorpapírral ellenőrizzük). Ezután 1 ml $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ oldatot adunk a hidrolizátumhoz. Melegítés hatására sárga, porszerű csapadék (ammónium-foszfor-molibdát) válik le.

2. Az élesztő lúgos hidrolízise

Feladat:

2 g nyers élesztőt dörzsöljük el azonos mennyiségű kvarchomokkal egy dörzscsészében. Majd dörzsöljük tovább a keveréket 10-20 ml 0,2 %-os NaOH oldat hozzáadásával krémszerű péppé. Mossuk át az élesztő oldatot egy 100 ml-es Erlenmeyer lombikba újabb adag NaOH-dal, hogy az össztérfogat 50 ml legyen. Melegítsük a szuszpenziót 30 percen át forró vízfürdőben, majd szűrjük át többrétegű gézen és hűtsük le. A szűrt szuszpenzió 2 ml-éhez adjunk 2 ml 10 %-os NaOH oldatot és 5-10 csepp 0,5 %-os CuSO_4 oldatot. (Biuret próba). Végezzük el a szűrletből a nukleinsav komponensek kimutatását is. A megmaradt, szűrt szuszpenzióhoz adjunk 20 ml 10 %-os kénsav oldatot és néhány percen át enyhén forraljuk az oldatot. Ismét végezzük el a Biuret próbát, valamint a közvetlen savas hidrolízisnél leírt próbákat. Állapítsuk meg, hogy milyen vegyületek vannak jelen a szuszpenzióban az enyhe savas hidrolízist követően.

II. Nukleinsavak kivonása és mennyiségi meghatározása

1. Nukleinsavak kivonása

A nukleinsavakat fehérjekomplexeikből detergenses szolubilizálással szabadítjuk ki. Az élesztőt (vagy friss csirkemájat) feltárjuk kvarchomokkal és a nukleinsavakat (DNS-t és RNS-t is) NaCl-EDTA-SDS oldattal 60°C-on extraháljuk. Kloroformos extrakcióval és alkoholos kicsapással tisztítjuk.

Anyagok: friss élesztő vagy csirkemáj
kvarchomok
toluol
NaCl-Na-dodecilszulfát oldat
diklórmétán-izoamilalkohol/24:1
metanol

Eszközök: dörzscsésze, üvegbot
centrifugacsövek, Pasteur pipetta
vízfürdők
táramérleg
mérőhenger, üvegbot
csiszolatos lombik

Feladat:

5 g élesztőt 2,5 g kvarchomokkal és néhány csepp toluallal alaposan eldörzsölünk hűtött dörzscsészében. 12 ml NaCl-Na-dodecilszulfát oldat részleteivel a masszát centrifugacsőbe mossuk, majd 60°C-os vízfürdőben üvegbottal 10 percig kevergetjük. A centrifugacsövet ezután lehűtjük és az extraktot 10 percig centrifugáljuk. A felülúszót csiszolatos lombikba öntjük és azonos térfogatú diklórmétán- izoamilalkohol eleggyel jól összerázzuk, majd az így keletkezett emulziót centrifugáljuk. A felső vizes fázist -amely az oldott nukleinsavakat tartalmazza - Pasteur pipettával leszívjuk és jégben lehűtött kis főzőpohárba öntjük. A lehűtött oldat nukleinsav tartalmát kétszeres térfogatú hűtött etanollal kicsapjuk és 10 perc állás után a kiülepedett nukleinsavakat centrifugálással összegyűjtjük. Ebből készítünk hidrolizátumot a mennyiségi meghatározáshoz.

2. Nukleinsavak mennyiségi meghatározása

A nukleinsavak mennyiségi meghatározása történhet a bázis, a cukor vagy a foszforsav meghatározásával. A gyakorlat során az élesztő savas hidrolizátumának DNS és RNS tartalmát mérjük: A DNS-t difenilaminnal, az RNS-t orcinnal. Mivel a foszfor állandó, jól mérhető és sztöchiometrikus alkotórésze mindenféle nukleinsavnak, ezért ennek meghatározása is megbízható eredményt ad a nukleinsavakról.

A megfelelően előkészített szövetminták (élesztő vagy csirkemáj) közvetlenül használhatók a vizsgálatokhoz.

A gyakorlaton a cukor komponenst és az anorganikus foszfát tartalmat határozzuk meg. A cukor meghatározása a Schneider eljárás szerint színreakcióval történik. A ribonukleinsavakat ribóz tartalmuk alapján orcinnal (zöld színeződés), a DNS-t dezoxiribóz tartalmuk alapján difenilaminnal (kék színeződés) határozzuk meg. A szervetlen foszfát meghatározása Tausky és Shorr módszerével történik.

Eszközök: kémcsövek, pipetták, üvegbotok
jeges és 90°C-os vízfürdő
GBC 911/A fotométer, küvetták
milliméterpapír

Anyagok: nukleinsav-hidrolizátum
 100ug/ml RNS standard oldat
 500ug/ml DNS standard oldat
 100ug/ml foszfát standard oldat
 difenilamin oldat
 orcin oldat
 vas(II) szulfát-ammóniummolibdenát oldat (frissen készítendő):

5 ml 10 %-os ammóniummolibdenátot 50 ml-es mérőlombikba teszünk. Desztillált vízzel kb. 40 ml-re hígítjuk, majd 5g finoman porított vas(II) szulfátot oldunk benne és 50 ml-re egészítjük ki.

Feladat:

a.) RNS mennyiségi meghatározása orcinnal

Állítsuk össze a következő reakció elegyeket!

	Próba		Referencia -sor			
Kémcsövek	1	2	3	4	5	6
			Oldatok(ml)			
NS hidrolizátum	0,1	0,1	-	-	-	
RNS standard	-	-	-	0,5	1,0	1,5
HCl	1,4	1,4	1,5	1,0	0,5	-
Orcin	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

A reakcióelegyeket alaposan összerázzuk és 20 percre forrásban lévő vízfürdőbe helyezzük. Lehűlés után mérjük az oldatok fényelnyelését 620 nm-nél.

b.) DNS mérés difenilaminnal

	Próba		Referencia-sor				
Kémcsövek	1	2	3	4	5	6	7
			Oldatok(ml)				
NS hidrolizátum	0,1	0,1	-	-	-	-	-
DNS standard	-	-	-	0,5	1,0	1,5	2,0
HCl	1,9	1,9	2,0	1,5	1,0	0,5	-
Difenilamin	4.0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

A kémcsöveket összerázzuk és 20 percre forrásban levő vízfürdőbe állítjuk. A lehűtött oldatok abszorpcióját 540 nm-nél mérjük.

A standard nukleinsav oldatokkal készített referenciasor alapján számítsuk ki az élesztőből (vagy csirkemájából) készített nukleinsav-hidrolizátum RNS és DNS tartalmát, valamint a két nukleinsav mennyiségének arányát.

c.) Anorganikus foszfát (P_i) meghatározása Tausky és Shorr szerint

Az eljárás csak anorganikus foszfát meghatározására szolgál, szervesen kötött foszfátot nem mér. Elve az, hogy kénsavas közegben ammóniummolibdenáttal a P_i ammóniummolibdénsavat képez, melyet ferroszulfáttal kék színű komplex vegyületté redukálunk. A kifejlődött szín 2 órán keresztül stabil és intenzitása arányos a P_i mennyiségével. Fotometriás úton referenciasor alapján az eredmény kvantitativé értékelhető.

Feladat:

Foszfát referenciasor készítése:

Kémcsövek:	1	2	3	4	5	6	7
µg P _i a reakció-elegyenben:	10	20	30	40	50	-	?
	Oldatok (ml)						
P _i -standard (100µg/ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	-	-
desztillált víz	4,4	4,3	4,2	4,1	4,0	4,5	4,5
P-reagens	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Hidrolizátum	-	-	-	-	-	-	0,5

A kémcsöveket összerázzuk és 10 perc múlva 700 nm-en fotometráljuk. A vakpróba értékének levonása után készített kalibrációs egyenest használjuk a savas hidrolizátumok P_i-tartalmának meghatározásához. A fenti reakcióhoz a hidrolizátum 0,5 ml-ét használjuk.

III. DNS oldat hiperkróm effektusának ("olvadáspont") mérése

A nukleinsavak, elsősorban a DNS denaturációja könnyen tanulmányozható a hiperkróm effektus megfigyelésével. A hő hatására bekövetkező despiralizációkor a hidrogén hidak megszűnése következtében növekszik a nukleobázisok elektronrendszerének gerjeszthetősége, ami 260 nm-nél fellépő abszorbancia növekedést okoz.

<u>Anyagok, eszközök:</u>	UV fotométer kvarcküveták vízfürdők 0,5 M KCl DNS preparátum (magas polimer fokú)
---------------------------	---

Feladat:

A DNS preparátumból olyan töménységű oldatot készítünk, hogy a szobahőmérsékleten mért elnyelése kb. 0,6 abszorbancia legyen 260 nm-nél. Ezután az oldatból 3-3 ml-t 15 percre 20, 60, 70, 80, 90°C-os vízfürdőbe helyezünk, majd 260 nm-nél mérjük az oldatok fényelnyelését.

A DNS denaturációja bár reverzibilis, de az eredeti szerkezet visszaállása lassan következik be, így a hőkezelt minták lehűthetők és az abszorbancianövekedés kényelmesen mérhető.

Ábrázoljuk grafikusan a hőmérséklet függvényében a minták fényelnyelését és értékeljük az észlelt jelenséget.

FEHÉRJÉK VIZSGÁLATA

I. Fehérjék színreakciói, kimutatásuk

A fehérjék nagy móltömegű, α -aminosavakból peptidkötéssel felépülő vegyületek.

Savak, lúgok vagy enzimek hatására valamennyi fehérje aminosavakra bomlik. A leggyakrabban a savas hidrolízist alkalmazzák fehérjék bontására: 20%-os sósavval kezelik 100°C-on 12-48 órán át.

A fehérjék kimutatására alkalmas néhány egyszerű színreakció, amely vagy a peptidkötéssel (biuret-reakció) vagy valamely aminosav- oldallánccal való kémiai reakción alapul (Millon, xantoprotein, Adamkievicz reakció).

Eszközök: kémcső
pipetta
Bunsen égő
Erlenmeyer lombik

Anyagok: urea
12 %-os NaOH
10 %-os CuSO₄
cc.HNO₃
cc.H₂SO₄
fenolos víz
jégecet
ninhidrin oldat
Millon reagens
tojásfehérje oldat
zselatin oldat
5 %-os ólom-acetát

1. Biuret reakció

Általános reakció, valamennyi fehérjére pozitív. A reakció neve onnan ered, hogy a biuret ugyanolyan színnel adja a reakciót, mint a fehérjék. Ha a fehérjét lúgos közegben kevés CuSO₄-tal kezeljük, ibolyás szín figyelhető meg, amelyet a peptid kötés Cu²⁺ ionokkal képzett koordinációs komplexe ad.

Feladat:

a.) Először ureából előállított biurettel végezzük el a reakciót. Néhány ureakristályt száraz kémcsőben gyenge lángon melegítsünk meg. Az urea először folyékonyvá válik, majd újra megszilárdul. Ekkor hagyjuk abba a melegítést. A melegítés hatására az ureából biuret képződött és ammónia szabadult fel. A biuretet 1 ml 12 %-os NaOH-val meglúgosítjuk, az oldathoz egy csepp rézszulfátot adunk. Összerázás után jellegzetes ibolyásrózsaszín szín

figyelhető meg. (Ne adjunk hozzá túl sok CuSO_4 -ot, mert a keletkező rézhidroxid kék színe elfedi a reakciót).

b.) Végezzük el a biuret reakciót fehérjével. Kb. 1 ml fehérjeoldatot mérjünk egy kémcsőbe, adjunk hozzá 2 ml 12 %-os NaOH-oldatot és 2 csepp CuSO_4 -oldatot. Rázzuk össze a kémcső tartalmát.

2. Xantoprotein-reakció

Aromás aminosavakat (fenil-alanin, tirozin, triptofán) tartalmazó fehérjékre specifikus. Tömény salétromsavval való hevítés hatására az aromás gyűrű nitrálódik, sárga szín figyelhető meg, ammónia hozzáadására narancsszínbe csap át.

Feladat:

a.) Először fenollal végezzük el a reakciót. Kémcsőben kb. 1 ml fenolos vízhez adjunk néhány csepp salétromsavat. Óvatos melegítés hatására sárga szín keletkezik.

b.) Végezzük el fehérjével a reakciót. Kémcsőben kb. 1 ml fehérjeoldathoz adjunk 5-6 csepp cc. salétromsavat. A sav hatására a fehérje kicsapódik, óvatos melegítésre megsárgul. Ha a kémcsőveket lehűtjük és meglúgosítjuk, a sárga szín narancsba megy át.

3. Millon-reakció

A reakció fenolos hidroxil csoportra specifikus, így tirozin-tartalmú fehérjékre pozitív. A reagens Hg^+ , Hg^{2+} ionokat és salétromsavat tartalmaz, hatására vörös csapadék képződik, ami valószínűleg a nitrált tirozin Hg(II) -sója.

Feladat:

a.) Először fenollal végezzük el a reakciót. Kémcsőben kb. 1 ml fenolos vízhez adjunk pár csepp Millon reagenst. Óvatos melegítésre rózsaszín elszíneződést kapunk.

b.) Végezzük el fehérjével is a Millon-reakciót. Kémcsőben kb. 2 ml fehérje oldathoz adjunk 5-6 csepp Millon reagenst. A fehérje kicsapódik, óvatos melegítésre a csapadék vörös színű lesz.

A Millon reagenst ne adjuk nagy feleslegben, különben a benne levő salétromsav a fehérjével xantoprotein reakciót ad, ami elfedi a Millon reakciót.

4. Adamkiewicz-reakció (Hopkins-Cole teszt)

A reakció triptofánra specifikus: a triptofán indol csoportja jégecettel (vagy glioxil-savval), cc. kénsav jelenlétében színes komplexet ad.

Feladat:

a.) Kémcsőben néhány csepp tojásfehérje-oldathoz adjunk kb. 0,5 ml jégecet, majd a kémcsövet ferdén tartva (hogy a folyadékok ne keveredjenek egymással) óvatosan rétegezzünk alá 2 ml cc. kénsavat. Néhány perc múlva a két réteg határán vöröses-ibolya gyűrű figyelhető meg.

b.) Ismételjük meg a reakciót zselatin-oldattal.

5. Ninhidrin-reakció

Rendkívül fontos színreakció, valamennyi aminosavra pozitív. A ninhidrin reakciót eltejedten használják a kromatográfiában aminosavak kimutatására, és (a képződött komplex színintenzitása alapján) mennyiségi meghatározására.

Fehérjék, peptidek esetén a ninhidrin a terminális aminocsoporttal és a lizin aminocsoportjával reagál. Minél nagyobb a fehérje molekulásúlya illetve minél kisebb a lizintartalma, annál kevésbé érzékeny a módszer.

Feladat:

Kémcsőben 5 ml fehérjeoldathoz adjunk 1 ml 0,1%-os ninhidrin-oldatot. Keverjük össze és forraljuk fel az oldatot: lilás színt figyelhetünk meg.

6. Kéntartalmú aminosavak kimutatása (unoxidized sulfur test)

Ha kéntartalmú aminosavat lúggal forralunk, a kénhidrogén vagy diszulfid csoportok szerveszulfidokká alakulnak át. Ha ólom-acetátot adunk az oldathoz, fekete ólom-szulfid csapadék képződik.

Feladat:

Egy kis Erlenmeyer lombikba adjunk 2 ml tojásfehérje oldatot, 5 ml 10%-os NaOH-oldatot és 2 csepp 5%-os ólom-acetát oldatot. Keverjük össze az oldatot, és néhány percig óvatosan melegítsük.

II. Fehérjék kicsapása, denaturáció

1. Fehérjék kisózása

A fehérjék hidofil kolloidok, azaz nagymértékben hidratáltak. Ha fehérjeoldathoz adott könnyűfém sók ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , NaCl , MgSO_4 bizonyos koncentrációt érnek, akkor a fehérjerészecskéket dehidratálják, aminek következtében a fehérjék kicsapódnak. A kicsapódásnál a dehidratáláson kívül töltéscsökkenés is szerepet játszik.

A fehérjék könnyűfém sók segítségével történő kicsapását kisózásnak nevezzük.

A kisózásnál nyert fehérjecsapadék az oldatban levő sókoncentráció csökkentésével (dialízis, hígítás) újra feloldható. Tehát a kisózás a reverzibilis kicsapási módszerekhez tartozik.

Mivel az egyes fehérjék különböző sókoncentrációnál csapódnak ki, a kisózást is felhasználhatjuk a fehérjék egymástól történő elválasztására.

Kisózásra leggyakrabban $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot használnak jó oldékonysága miatt. A kisózásnál a kicsapás mértéke a sókoncentráció mellett a hőmérséklettől is függ. A hőmérséklet emelésével a kicsapódás mértéke növekszik.

Eszközök: állvány és kémcsövek
kis tölcser
pipetták

Anyagok: fehérje oldat, mely albumint, globulint és NaCl-ot tartalmaz
telített ammóniumsulfát
finoman eldörzsölt ammóniumsulfát kristályok
finoman eldörzsölt NaCl kristályok
finoman eldörzsölt MgSO₄ kristályok
1 %-os ecetsav

Feladat:

a.) Kémcsőben 5 ml fehérjeoldathoz azonos térfogatú, telített ammóniumsulfát-oldatot öntünk, így félig telített ammóniumsulfát-oldatot nyerünk. Néhány perces állás után a globulinok kicsapódnak. A csapadékot leszűrjük. A szűrlet tartalmazza az albuminokat. A szűrlethez teljes telítésig jól eldörzsölt ammóniumsulfát kristályokat adunk. (Teljes telítésnél az újonnan hozzáadott kristályok már nem oldódnak.) A telített ammóniumsulfát oldatból az albuminok csapadék formájában kiválnak. Ezt a csapadékot is leszűrjük.

b.) Két tiszta kémcsőbe 3-3 ml fehérjeoldatot öntünk. Az egyik kémcsőbe NaCl-ot, a másikba MgSO₄-ot adunk teljes telítésig. Néhány perc múlva mindkét kémcsőben kicsapódnak a globulinok. A csapadékot ismét leszűrjük. A szűrlet tartalmazza az albuminokat, mivel ezeket NaCl és MgSO₄ neutrális közegben nem tudja kicsapni. A szűrlethez néhány csepp ecetsavat adunk. A gyengén savanyú közegben az albuminok kicsapódnak.

2.Fehérjék kicsapása alkohollal

A fehérjék számos neutrális szerves oldószerben (etanol, metanol, éter, aceton stb.) nem oldódnak. Ha a fehérjék vizes oldatához például alkoholt öntünk, akkor az egyes fehérjék meghatározott alkoholkoncentráció elérésénél kicsapódnak. Az oldatnak neutrálisnak vagy gyengén savanyúnak kell lennie. A szerves oldószerekkel történő kicsapás a közeg dielektromos állandójának csökkenésével magyarázható. A dielektromos állandó csökkenése minden fehérje oldékonyságát csökkenti. A módszer előnye, hogy a szerves oldószer adagolásával párhuzamosan az oldat hőmérsékletét akár 0° alá is csökkenthetjük.

Kismennyiségű só (pl. NaCl) hozzáadásával fokozhatjuk a csapadék kiválásának sebességét. Az ionok ugyanis a kolloidrészecskékhez kapcsolódva csökkentik azok töltését, és így elősegítik a fehérjék kicsapódását.

Ha az alkohol segítségével nyert csapadékot gyorsan elválasztjuk az alkoholtól, a fehérje nem denaturálódik, s így a kicsapás reverzibilis. Ha ellenben az alkoholos csapadékot huzamosabb ideig állni hagyjuk, akkor a fehérjék denaturálódnak, többé vízben fel nem oldhatók, a kicsapás irreverzibilis.

Eszközök: állvány és kémcsövek
pipetták

Anyagok: fehérjeoldat

etanol
NaCl kristályok

Feladat:

Kémcsőben kb. 2 ml fehérjeoldathoz néhány NaCl kristályt adunk. ezután a kémcsőbe lassan néhány ml etanolt öntünk, és erősen összerázzuk. Rövid idő múlva finom, fehér csapadék válik ki.

A kémcső felrázása után tartalmának kb. a felét egy másik kémcsőbe öntjük, majd vizet adunk hozzá, aminek következtében az alkohol felhígul és a fehérje ismét feloldódik.

3.Fehérjék kicsapása nehézfémekkel

A fehérjék a nehézfémekkel (ólom, ezüst, réz, higany stb.) komplex vegyületet alkotnak és oldatukból kicsapódnak. Az alkáli és alkáli földfémekkel történő kisózással ellentétben a nehézfémek kis koncentrációja is elég a fehérjék kicsapásához. A nehézfémekkel nyert csapadék azonban a sókoncentrációnak hígítással vagy dialízissel történő csökkentésével sem oldódik újra. Ez azt jelenti, hogy a kicsapás irreverzibilis.

A fehérjéknek azt a tulajdonságát, hogy nehézfémekkel komplexet képeznek, az orvosi gyakorlatban arra használjuk, hogy fehérjéket (tej, tojás) mint ellenmérgeket adjuk higany (szublimát), ólom (rossz minőségű ónozás) vagy réz (rézoxidos edények) mérgezéseknél, amíg ezek a sók fel nem szívódnak. Megjegyezzük, hogy a fehérjék kicsapására használt nehézfémek közül pl. az ólomacetátot és rézszulfátot nem szabad feleslegben adni, mivel az eredetileg képződött csapadék sók feleslegében oldódik.

Eszközök: állvány és kémcsövek
pipetták
üvegbotok

Anyagok. fehérjeoldat
0,5 %-os ólomacetát
1 %-os rézszulfát
3 %-os ezüstnitrát
0,5 %-os szublimát

Feladat:

Négy kémcsőbe 2-3 ml fehérjeoldatot öntünk. Az első kémcsőbe cseppenként ólomacetátot, a másodikba rézszulfátot, a harmadikba ezüstnitrátot, a negyedikbe szublimátot (óvatosan,méreg!!) öntünk. Mind a négy kémcsőben csapadék képződik.

Ha az ólomacetát és rézszulfát hatására keletkezett csapadékhoz ólomacetátot ill. rézszulfátot adunk feleslegben, akkor a csapadék oldódik.

4. Fehérjék kicsapása alkaloid reagensekkel

A fehérjeoldatok az un. alkaloid reagensek hatására kicsapódnak. Ezek közé tartoznak : a tannin, a pikrinsav, a $K_4Fe(CN)_6$, a $KI \cdot HgI_2$ és KI , BiI_3 és néhány más vegyület. A fehérjék azon tulajdonsága, hogy alkaloid reagensekkel kicsaphatók, a fehérjékben és alkaloidokban egyaránt előforduló nitrogént tartalmazó csoportok jelenlétével magyarázható.

Az alkaloid reagensek csak savanyú közegben képesek kicsapni a fehérjét, míg lúgos közegben a csapadék oldódik.

Eszközök: állvány és kémcsövek
pipetták

Anyagok: fehérjeoldat
telített pikrinsav
telített tannin
1 és 10 %-os ecetsav
káliumjodidos higanyjodid
10 %-os sósav
5 %-os kálium-hexaciano-ferrát

Feladat:

Két kémcsőbe 2-3 ml fehérjeoldatot öntünk. Mindkettőhöz néhány csepp ecetsavat adunk.

Az egyik kémcsőbe telített tanninoldatot, a másikba pikrinsavat öntünk és megfigyeljük a fehérje kicsapódását.

A harmadik kémcsőbe 2-3 ml fehérjeoldatot öntünk, 10 %-os ecetsavval megsavanyítjuk. Cseppenként kálium-hexaciano-ferrátot adunk hozzá és minden csepp után összerázzuk. A fehérjék kicsapódnak.

A negyedik kémcsőbe is 2-3 ml fehérjeoldatot öntünk, sósavval kissé megsavanyítjuk és néhány csepp higanyjodidos káliumjodidot cseppentünk hozzá. Megfigyeljük a fehérjék kicsapódását.

5. Fehérjék kicsapása ásványi savakkal

Koncentrált ásványi savak (H_3PO_4 kivételével) a fehérjét oldatukból irreverzibilisen csapják ki. Ez a kicsapás a fehérjék dehidratációjával magyarázható, de ezenkívül még más okok is szerepelnek. (Pl.: sóképződés fehérjékből és savakból stb.). Ásványi savak feleslegében a képződött csapadék általában oldódik, salétromsav feleslegében viszont nem következik be.

Különösen fontos a fehérjék salétromsavas kicsapása, amit pl. a klinikumban a vizeletben levő fehérje kvalitatív és kvantitatív kimutatására használnak.

Eszközök: állvány és kémcsövek
pipetták

Anyagok: cc. sósav
cc. kénsav
cc. salétromsav

fehérjeoldat

Feladat:

Három kémcsőbe 1-1 ml sósavat, kénsavat ill. salétromsavat öntünk, majd 1 ml fehérjeoldatot pipettázunk hozzájuk. A két folyadék tartalmát óvatosan összerázzuk. A csapadék sósav és kénsav feleslegében oldódik. A salétromsavat tartalmazó kémcsőben viszont a csapadék nem tűnik el, mivel a salétromsav feleslegében nem oldódik.

6. Fehérjék kicsapása szerves savakkal

A fehérjéket szerves savakkal is kicsaphatjuk. A különböző szerves savak hatása azonban nem egyforma. Nagyon alkalmas fehérjék kimutatására a triklórecetsav és a szulfoszalicilsav. E két savat a gyakorlatban kiterjedten használják gyors és egyszerű fehérjekimutató eljárásra.

A triklórecetsav kiválóan alkalmas biológiai folyadékok (pl. vérsavó fehérjementesítésére), mivel csak a fehérjéket csapja ki és az összes kisebb molekulásúlyú peptid (fehérjehasadási termékek) oldatban maradnak. Ez különösen fontos akkor, amikor külön-külön akarjuk meghatározni a fehérje és az alacsony molekulásúlyú termékek (aminosavak, urea stb.) nitrogénjét, amit "maradék nitrogénnek" nevezünk.

Ha a fehérjék kicsapása után a szűrletből el akarjuk távolítani a triklórecetsavat, akkor a szűrletet fel kell forralnunk. A triklórecetsav forralásra kloroformra és szén-dioxidra bomlik, melyek elpárolognak.

Eszközök: állvány és kémcsövek
pipetták

Anyagok: 3 %-os triklórecetsav
20 %-os szulfoszalicilsav
fehérjeoldat

Feladat:

Kémcsőbe 2-3 ml fehérjeoldathoz néhány csepp triklórecetsavat adunk. A fehérje csapadék formájában kiválik. Másik kémcsőben levő fehérjeoldathoz néhány csepp szulfoszalicilsavat adunk. A fehérje kicsapódik.

III. Zselatin izoelektromos pontjának mérése

Az a körülmény, hogy a fehérjék oldatban, adott pH-n elektromos töltést viselnek felhasználható a fehérjék izoelektromos pontjának meghatározására.

Az izoelektromos ponton a fehérje netto töltése nulla, hidratburka a legkisebb, a felületén elhelyezkedő disszociáló csoportok a szomszédos csoportokkal elektrosztatikus

kölcsönhatást alakítanak ki, és a fehérjemolekulák kapcsolódhatnak is egymással. Az izoelektromos pH-n a fehérjék az oldatból kicsapódhatnak.

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
pipetta (2, 5, 10 ml-es)

Anyagok: 0,1 M nátrium-acetát
0,1 M ecetsav
1 M ecetsav
1%-os zselatin oldat
etanol

Feladat:

Határozzuk meg a zselatin izoelektromos pontját!

Állítsuk össze a következő 6 kémcsőből álló sorozatot!

	Oldatok/ml					
Kémcső	1	2	3	4	5	6
0,1 M Nátrium-acetát	2	2	2	2	2	2
0,1 M Ecetsav	0,25	0,5	1	2	4	-
1 M Ecetsav	-	-	-	-	-	3,2
Desztillált víz	3,75	3,5	3	2	-	3,2
pH	?	?	?	?	?	?(meghatározandó)
1%-os zselatin	2	2	2	2	2	2

A kémcsövek tartalmát összerázzuk. A 4. kémcsőbe keverés közben annyi alkoholt pipettázunk, hogy rövid ideig tartó állás után alig észrevehető mennyiségű csapadék képződjék. (Ehhez rendszerint 8 ml szükséges). Az összes többi kémcsőhöz ugyanannyi alkoholt teszünk. 30 percen keresztül figyeljük a zavarosodás mértékét. Ahol a legerőteljesebb zavarosodás észlelhető azon a pH-n van a zselatin izoelektromos pontja.

IV. Fehérjék tisztítása dialízissel

A dialízisnél a kolloidokat félig áteresztő hártya segítségével választjuk el a kismolekulájú szerves és ásványi szennyeződésektől. Az ilyen hártyán keresztül a szennyező anyagok szabadon diffundálnak, míg a kolloidok számára a hártya gyakorlatilag átjárhatatlan. A fehérjerészecskék nagyságuknál fogva nem tudnak a dializáló hártyán kidiffundálni. A fehérjéknek ezt a tulajdonságát felhasználjuk arra, hogy könnyen átdiffundáló, alacsony molekulásulú szennyeződésektől megtisztíthassuk őket.

Eszközök: celofán
főzőpohár
spárga
mágneses keverő
kémcső, kémcsőállvány
pipetta (2, 10 ml-es)
szemcseppentő

Anyagok: fehérjeoldat
1%-os ezüstnitrát oldat
10%-os NaOH
1%-os CuSO₄

Feladat:

NaCl-t tartalmazó tojásfehérje dialízise:

Készítsünk kb. 15x15 cm-es celofánból dializáló zacskót. Mérjünk bele 10 ml NaCl-os fehérjeoldatot, majd zárjuk le spárgával. Helyezzük el egy 200 ml desztillált vizet tartalmazó főzőpohárban úgy, hogy csak a hártyán keresztül érintkezhessen a két folyadék. A dializáló oldatot mágneses keverővel kevertessük.

1 óra múlva ellenőrizzük a dializátum összetételét. A klorid ionok kimutatására 2 ml dializátumot pipetázzunk kémcsőbe és adjunk hozzá néhány csepp ezüstnitrát oldatot. A fehérjetartalom vizsgálatához 2 ml dializátumhoz adjunk 1 ml NaOH-ot és 1 ml CuSO₄-t.

V. Szérum aminosav tartalmának meghatározása ioncserélő vékonyrétegkromatográfiával és hagyományos VRK-val

Az ioncserélő vékonyrétegek egyesítik az ioncserélő gyanták nagy hatékonyságát a vékonyréteg-kromatográfiás technika elegáns egyszerűségével. A Polygram Ionex-25 SA-Na

rétegek erős kationcserélő tulajdonságúak. A kationcserélő gyanta több komponensű kötőanyag segítségével műanyag fóliára van rögzítve. A rétegben rögzített gyanta felbontóképesség tekintetében maga mögött hagyja a hagyományos vékonyréteget. Alkalmas aminosavak, kis tagszámú peptidek, antibiotikumok, aminok, szerves ionok kromatográfiás vizsgálatára. Nélkülözhetetlen segédeszköz biológiai folyadékok (vér, vizelet) vizsgálatára. Egy dimenziós kromatográfiával a szérum és vizelet aminosav összetétele meghatározható, így a kationcserélő réteg alkalmas az aminosav összetétel megváltozásával járó aminosav-anyagcsere zavarok gyors kimutatására. A veleszületett rendellenességek közül leggyakoribb a fenilketonuria, amire jellemző a fenilalanin felszaporodása a szérumban és vizeletben. A módszer így használható újszülöttek fenilketonuria szűrővizsgálatára is.

Az aminosavak elválaszthatósága függ a puffer összetételétől (pH, ionerősség stb.). A gyakorlaton alkalmazott pH=5,28 nátrium-citrát pufferben a bázikus és aromás aminosavak választhatók el jól egymástól.

Eszközök: ioncserélő réteg
kromatográfiás kád
mikropipetta
hajszáritó
centrifuga, centrifugacsövek

Anyagok: aminosav standardok
nátrium-citrát puffer, pH=5,28
szérum
ninhidrin

Feladat:

I. Ioncserélő VRK:

A minta előkészítése:

0,5 ml szérumhoz 1 ml 10%-os triklórecetsavat adunk, alapos összerázás után a csapadékot centrifugáljuk. A tiszta felüliszót új csőbe öntjük, 1 ml étert adunk hozzá, az elegyet jól összerázzuk, majd hagyjuk a fázisokat szétválni.

Kromatográfiához az alsó, vizes fázist használjuk. Az éteres kirázással a kromatográfiát zavaró triklórecetsavat távolítjuk el.

A lemez előkészítése:

Puha grafit ceruzával a lemez alsó szélétől 1 cm távolságra "start-vonalat" húzunk, ezen kijelöljük a felcseppentési pontokat. A kijelölt pontokra mikropipettával felcseppentjük a 10 µl előkészített mintát és az aminosav standardokat. Felvitel közben a lemezt levegőárammal (hajszáritóval) szárítjuk.

Kromatografálás:

A kromatográfiás kádat 1 cm magasságig megtöltjük pufferrel és beállítjuk a megfelelően előkészített lemezt. A kromatografálás addig tart, amíg a pufferfront a lemez tetejéig nem ér (ez kb. 50-60 percet vesz igénybe).

Az aminosavak előhívása:

A kádból kiemelt ioncserélő lemezt hajszáritóval megszáritjuk.. Ninhidrinnel egyenletesen bepermetezzük, és ismét megszáritjuk meleg levegővel. A megjelenő aminosav-foltokat a standard aminosav-keverékkel (és egymással) összehasonlítva értékeljük. Az aminosavak futási sorrendje a felcseppentési ponttól: Arg, Hys, Phe Tyr, Leu, Val, Gly.

II. Hagyományos VRK:

Réteg: 5554 Merck Kieselgel készréteg

Eluens: butanol:ecetsav:víz= 4:1:1

Előhívó: alkoholos ninhidrin oldat

A kromatografálás kivitelezése megegyezik az előző feladatban leírtakkal.

VI. Sephadex G-25 oszlop térfogati paramétereinek meghatározása

Az oszlop üres térfogatának és össztérfogatának meghatározására színes vegyületeket használunk. A gyakorlaton egy három komponensű elegyet választunk szét: a kék dextránt (dextran blue), a B₁₂ és a B₂ vitamint. A dextran blue molekulatömege 1000000, így nem járja be a gélszemcsékben lévő járatokat, hanem a szemcsék között könnyen átfolyik. A B₁₂ vitamin lényegesen lassabban halad át az oszlopon, a molekula mérete éppen az elválasztási tartományba esik (molekulatömege: 1355). A B₂ vitamin molekulatömege 376, így bejut a gélszemcsék legszűkebb járataiba is, és még lassabban halad az oszlopon, mint a B₁₂ vitamin.

Eszközök: kromatografáló oszlop
mérőhengerek
Erlenmeyer lombik

Anyagok: 0,9 %-os NaCl oldat
dextran blue
B₁₂ és B₂ vitamin
Sephadex G-25

Feladat:

Oldjunk fel 10 mg dextran blue-t, egy ampulla B₁₂ vitamint és néhány kristály B₂ vitamint 1 ml fiziológiás sóoldatban. Engedjük az oszlopon levő sóoldatot a töltet tetejéig lefolyni, majd zárjuk el a kifolyó nyílását. Pipetázunk óvatosan az oszlop tetejére 1 ml oldatot, a kifolyó nyílást nyissuk meg hogy a minta a gélbe szívódjon. Ezután 3 ml sóoldatot pipetázzunk a gél tetejére, majd az oszlopot a sóoldattal telt lombikhoz csatlakoztatva folyamatosan eluáljuk az anyagokat. Mérőhengerbe felfogva az eluátumot, mérjük azt a

térfogatot, míg a kék dextrán kék színe megjelenik az eluátumban, ez lesz az üres térfogat (V_k) értéke. Megmérjük azt a térfogatot, amelyben a kék szín eluálódik (b), majd tovább eluálva az oszlopot, megmérjük azt a térfogatot, míg a B₁₂ vitamin rózsaszín színe, és legvégül a B₂ vitamin sárga színe megjelenik az eluátumban. Ez utóbbi az össztérfogatot (V_t)-t adja.

Állapítsuk meg a B₁₂ vitamin V_e értékét és határozzuk meg a K_d -t.

VII. Szérumfehérjék mennyiségi meghatározása és frakcionálása

A fehérjeoldatok frakcionálásának egyik egyszerű módja a kisózás. Nagy mennyiségű só csökkenti a fehérjék hidratburkát és így elsősorban a globuláris fehérjék oldhatóságát. Ha szérumot ammónium-szulfáttal félig telítünk, a globulinok kicsapódnak, de az albumin oldatban marad. A gyakorlat során a szérum globulinokat kisózzuk, majd centrifugálással szeparáljuk. Az albumin frakciót gélszűrővel szulfát-mentesítjük Sephadex G-25 oszlopon. A szérum és a szérum frakciók fehérjetartamát biuret reakcióval és brómkrezolbíborral határozzuk meg. A brómkrezolbíbor indikátor festék. Megfelelő savas pH-n az albuminhoz specifikusan kötődik, miközben megváltozik a színe. A színváltozás arányos az albumin koncentrációval.

Eszközök: centrifuga, centrifugacsövek
pipetták
kémcsövek, kémcsőállvány
fotométer, küvetta
Sephadex G-25 oszlop

Anyagok: humán szérum
telített ammónium-szulfát oldat
0,9 %-os nátrium-klorid oldat
10 %-os bárium-klorid oldat (MÉREG !)
10 mg/ml fehérje standard
biuret reagens
10 mg/ml albumin törzsoldat
50 mg/ml brómkrezolbíbor oldat

Feladatok:

1. Globulinok kisóúzása

Centrifugacsőbe 3 ml szérumot pipetázunk, majd 3 ml telített ammónium-szulfát oldatot adunk hozzá. A csapadékot 5 percig állni hagyjuk, majd kb. 20 percig centrifugáljuk. A felülszót óvatosan leöntjük (albumin frakció), a csapadékot pedig 3 ml 0,9 %-os nátrium-klorid oldatban oldjuk (globulin).

2. Albuminok szulfát-mentesítése Sephadex G-25 oszlopon

Az oszlopot 0,9 %-os nátrium-klorid oldattal ekvilibráljuk. Az oldatot a gél felszínéig engedjük lefolyni, majd az albumin frakcióból 1 ml-t pipetázunk a gél tetejére. Az alsó nyílás megnyitásával hagyjuk, hogy a minta a gélbe hatoljon. A mintát 3 ml 0,9 %-os nátrium-klorid oldattal utánamossuk, majd az oszlopon folyamatosan nátrium-klorid oldatot áramoltatunk át. 20 megszámozott kémcsőbe 5 ml-es frakciókat gyűjtünk. Az egyes kémcsővekből 1-1 ml mintát veszünk fehérjemeghatározásra illetve szulfát kimutatásra.

3. Albumin meghatározása brómkrezolbíborral

Állítsuk össze a következő reakcióelegyeket:

Kémcsövek	Oldatok (ml)						
	1	2	3	4	5	6	7
Albumin	-	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	-
Szérum	-	-	-	-	-	-	0,01
0,9 %-os NaCl	0,2	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,19
Reagens	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

A reagens bemérése után az oldatokat összerázzuk és 5 percig szobahőn állni hagyjuk. Az abszorbancia értékeket 620 nm-nél leolvassuk. Az 1 - 6 kémcsőben levő oldatok fotometráálásánál kapott abszorbanciákat ábrázoljuk az oldatok albumin koncentrációjának függvényében. Az így kapott referencia görbe alapján számítsuk ki a szérum albumin tartalmát. Vessük össze az eredményt a biuret módszerrel kapott értékekkel.

VIII. Szérumfehérjék sómentesítése méretkizárási kromatográfiával

A fehérje analitikában gyakran van szükség sómentesítésre, vagy puffercserére aminek legegyszerűbb módszere a méretkizárási Sephadex G-25 oszlopon. A frakciók fehérje tartalmát fotometriásan határozzuk meg. A 280 nm hullámhosszon mért abszorbancia arányos az albumin koncentrációval. A mennyiségi meghatározáshoz Biuret reakciót használunk.

Eszközök: pipetták
kémcsövek, kémcsőállvány
fotométer, kuvetta
Sephadex G-25 oszlop

Anyagok: Marha szérum albumin (BSA)
0,9 %-os nátrium-klorid oldat
Ezüst-nitrát oldat (MÉREG !)

Feladatok:

BSA sómentesítése Sephadex G-25 oszlopon

Az oszlopot desztillált vízzel átmoszuk. A vizet a gél felszínéig engedjük lefolyni, majd a sótartalmú fehérje oldatból 2,5 ml-t pipetázunk a gél tetejére. Az alsó nyílás megnyitásával hagyjuk, hogy a minta a gélbe hatoljon. A lecsöpögő oldatot kémcsőbe gyűjtjük: 1. frakció. A mintát 3,5 ml desztillált vízzel eluáljuk: 2. frakció. Ezután desztillált vízzel mossuk az oszlopot 2-3 2 ml-es frakciót gyűjtünk (3-5 frakció). Az egyes kémcsövekből fehérje meghatározást és klorid ion kimutatást végzünk.

Fehérje tartalom kimutatása fotometriásan:

A géلكromatográfia során gyűjtött frakciók abszorbanciáját meghatározzuk 280 nm hullámhosszon. A mért értékeket táblázatban foglaljuk össze.

Cl⁻ tartalom kimutatása :

Az oldatban található Cl⁻ ionok csapadékot adnak Ag⁺ ionokkal. Valamennyi frakcióból 0,5 ml-t kiveszünk és néhány csepp AgNO₃ oldatot adunk hozzá. Fehér csapadék megjelenése, opálosodás Cl⁻ ionok jelenlétét mutatja.

Frakció	1	2	3	4	5
A ₂₈₀					
Csapadék Ag ⁺ ionnal					

Értelmezzék a táblázat adatait!

2. Szérum és szérum-frakciók fehérjetartalmának meghatározása biuret reakcióval

Állítsuk össze a következő reakcióelegyeket:

	Oldatok (ml)						
Kémcsövek	1	2	3	4	5	6	Minta
Fehérje standard	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	-
0,9 %-os NaCl	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	--	
Minta oldat	-	-	-	-	-	-1,0	
Biuret reagens	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

A reagens bemérése után a kémcsövek tartalmát összerázzuk és 20 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd 540 nm-nél leolvassuk az oldatok abszorpcióját. A standard oldatok koncentrációjának és abszorbanciájának felhasználásával kalibrációs görbét készítünk. A referencia görbe alapján számoljuk ki a minta fehérje koncentrációját.

IX. Lizozim izolálása tojásfehérjéből gélkromatográfiával

Tojásban, tejben, könnyben nagy mennyiségű lizozim található. Az enzim az N-acetil-muraminsav és N-acetil-glükózamin közötti β (1-4) glikozidos kötéseket bontja, így a baktériumok sejtfalát felépítő poliszacharid megbontásával a baktériumokat elpusztítja.

A lizozim a tojásfehérjéből könnyen izolálható, a tojásfehérjét alkotó egyéb fehérjéktől kisebb molekulatömege (14300) miatt géliszűrővel elválasztható.

A gyakorlaton tojásfehérje oldatot kromatografálunk Sephadex G-75- oszlopon. (A Sephadex G-75 a 3000-70000 moláris tömegű globuláris fehérjék frakcionálására alkalmas). Meghatározzuk az eredeti tojásfehérje oldat, valamint az oszlopról eluált frakciók fehérjetartalmát és lizozim aktivitását. A fehérjekoncentrációt biuret reakcióval mérjük, a lizozim aktivitására a *Micrococcus lysodeicticus* sejtuszpenzió zavarosságának csökkenéséből következtetünk: (A szuszpenzió zavarossága azért csökken, mert a lizozim feloldja a baktérium sejtfalát).

Eszközök: 2 x 25 cm-es Sephadex G-75 oszlop
kémcsövek, kémcsőállvány
pipetták
fotométer, küvetták

Anyagok: *tojásfehérje oldat:* (100 ml tojásfehérjét 200 ml 0,05 M Tris-HCl, pH=8.2 pufferrel összekeverünk majd üveggyapoton szűrünk. A szűrletet homogenizáljuk, centrifugáljuk. A kapott felülúszót használjuk a gélkromatográfiához).
eluáló puffer: 0,05M Tris-HCl, pH=8,2, amely 0,2 M NaCl-t tartalmaz
sejtuszpenzió: *Micrococcus lysodeicticus* baktériumsejtek 0,2g /l szuszpenziója
fehérje standard oldat: humán szérumalbumin (10 mg / ml)
biuret reagens
0,05 M-os foszfát puffer, pH =6,3
20%-os szulfosalicilsav

Feladat:

1. Néhány csepp szulfosalicilsavval kémcsőben ellenőrizzük, hogy az oszlop fehérjementes-e? Ha nem, akkor mossuk az oszlopot az eluáló pufferrel fehérjementesre.

2. Végezzük el a géliszűrést: Engedjük a puffert a géloszlop tetejéig lefolyni, majd zárjuk el az oszlop kifolyó nyílását. Pipetázzunk óvatosan 3 ml tojásfehérje oldatot az oszlop tetejére. A kifolyó nyílást megnyitva várjuk meg, míg a minta behatol az oszlopba, majd néhány ml eluáló pufferrel óvatosan mossuk utána az üvegcső falára tapadt tojásfehérje oldatot is. Csatlakoztassuk az oszlopot egy eluáló pufferrel telt lombikhoz és a csap megnyitásával folyamatosan eluáljuk az oszlopot. 20 db. frakciót szedünk, a frakciók térfogata 5 ml, az átfolyási sebesség 3 ml / perc.

3. Határozzuk meg az eredeti tojásfehérje oldat és a géloszlopról eluálódott frakciók fehérjetartalmát

Fehérjemeghatározás biuret reakcióval

Először készítsünk referenciasort:

	Oldatok(ml)					
Kémcsövek	1	2	3	4	5	6
Fehérje standard	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Tris-HCl puffer	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	-
Biuret reagens	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Az oldatokat összerázzuk, majd 30 perc múlva fotometráljuk 540 nm-nél. (A fotométert pufferre nullázzuk). Ezután végezzük el a biuret próbát az első 20 elució frakció 1,0-1,0 ml-ével, valamint a tojásfehérje oldat 0,1 ml-ével. Számítsuk ki a referenciasor alapján a frakciók és a tojásfehérje oldat fehérjetartalmát!

4. Határozzuk meg az eredeti tojásfehérje oldat és az eluálódott frakciók lizozim aktivitását.

Lizozim aktivitásának meghatározása

Az aktivitásméréshez az eredeti tojásfehérje oldatot 100- szoros, az enzimet tartalmazó eluált frakciókat 50-szeres hígításban használjuk.

A fotométert 0,05 M-os foszfát pufferre nullázzuk. Pipetázzunk a küvettába 1,5 ml mérendő oldatot és 1,5 ml sejtszuszpenziót és mérjük meg az oldat abszorpciójának (zavarosságának) 2 perc alatti csökkenését 430 nm-nél. Ha a 2 perc alatti abszorpció változás nagyobb 0,1-nél, a vizsgált frakciót hígítsuk foszfát pufferrel.

A lizozim aktivitását a 430 nm-en 2 perc alatt bekövetkező abszorpció csökkenéséből számítjuk ki.

$$\text{aktivitás} = \Delta A_{430}^{2\text{perc}} \times \text{hígítás}$$

5. Ábrázoljuk grafikusan a frakciók fehérjetartalmát és lizozim aktivitását. Számítsuk ki, hogy az oszlopra felvitt 3 ml hígítatlan tojásfehérje oldat fehérjetartalmának és lizozim aktivitásának hány %-át kaptuk vissza az eluált frakciókban.

X. Fehérjék molekulatömegének meghatározása SDS-poliakrilamid gradiens gélelektroforézissel

A relatív molekulatömeg (M_r) meghatározására a vizsgálandó fehérjét ionos detergenssel, pl. nátrium-dodecilszulfáttal (SDS) kezelik. Ennek célja kettős. Egyrészt a detergens közömbösíti a fehérje saját töltéseit, másrészt megszünteti az alegységek közötti kölcsönhatásokat, ha azok nem diszulfid kötések.

A diszulfid kötés felszakítására β -merkaptó-etanolt is adnak a rendszerhez a detergensen kívül. Ilyen körülmények között a fehérje mozgékonyágát elektromos térben csak a mérete befolyásolja és annak alapján ismert molekulatömegű fehérjék mozgékonyágához hasonlítva meghatározható a molekulatömeg.

Az SDS jelenlétében végzett gélelektroforézis a legelterjedtebb módszer a fehérjék alegység molekulatömegének meghatározására. Az enzim illetve fehérjepreparátumok tisztaságának egyik legalapvetőbb kritériuma az SDS gélelektroforézissel igazolható homogenitás. A módszer különösen alkalmas bonyolultabb fehérjeasszociátumok, multienzim komplexek, riboszómák, membránok, miofibrillum vizsgálatára.

A gyakorlat során az emlős vázizom miofibrillum fehérjekomponenseit detektáljuk MINI-PROTEAN II (BIO RAD) készülék segítségével. A molekulatömeg meghatározására szolgáló kalibrációs görbe felvétele céljából ismert molekulatömegű un. kalibráló fehérjéket is futtatunk ugyanazon gélen. A denaturáló közeg jelenlétében alegység molekulatömeg értékeket határozunk meg, így a fehérjék tényleges molekulatömegének kiszámításához az alegység szerkezet ismerete is szükséges.

Eszközök: gélelektroforézis készülék MINI-PROTEAN II (BIO-RAD)
egyenfeszültségű tápegység
gradiens keverő (BIO-RAD)
perisztaltikus pumpa VARIOPERPEX II (BIO-RAD)

Oldatok:

1. 30 %-os poliakrilamid oldat
2. 1,5 M-os Tris-HCl puffer pH=8,8
3. 0,5 M-os Tris-HCl puffer pH=6,8
4. 10 %-os SDS oldat
5. minta-puffer
6. elektrolizáló puffer
7. 10 %-os ammónium-perszulfát oldat (frissen készítve)
8. 0,1 %-os Coomassie-Blue oldat
9. mosó oldat
10. molekulatömeg standard

Feladat:

Az elektroforézis készülék összeállítása, a gél oldat elkészítése és beöntése, a minta felvétele, a festés a gyakorlat vezetőjének instrukciói alapján történik.

A minták előkészítése:

A mintákat ötszörösére hígítjuk az **5.** minta-pufferrel, és 4 percig 100 °C-on, vagy 10 percig 70 °C-on melegítjük őket.

A gélek preparálásához felhasznált oldatok:

I. 5 %-os gél (3 ml): 1,725 ml desztillált víz, 0,75 ml **2.** puffer, 30 µl **4.** oldat, 0,5 ml **1.** oldat, majd 15 µl **7.** oldat és 1,5 µl TEMED. A gélkomponenseket tartalmazó oldatot a **7.** oldat és TEMED hozzáadása előtt 15 percig vákuumban leszívjuk (levegőmentesítés).

II. 20 %-os gél (3 ml): 0,225 ml desztillált víz, 0,75 ml **2.** puffer, 30 µl **4.** oldat, 2,0 ml **1.** oldat majd 15 µl **7.** oldat és 1,5 µl TEMED. A gélkomponenseket tartalmazó oldatot a **7.** oldat és TEMED hozzáadása előtt 15 percig vákuumban leszívjuk.

A gélek preparálása:

Az 5-20 %-os géllapokat a gradienskeverő és a perisztaltikus pumpa segítségével készítjük el. A mintafelvitelt követően a futtatást 200 V állandó egyenfeszültségen végezzük. Várható futtatási idő 30-45 perc, az eljárás szobahőn végezhető. Ajánlott molekulatömeg standard : Pharmacia Electrophoresis Calibration Kit.

A gélek festése:

A géleket 500 ml **8.** oldatban áztatjuk 50 °C-on 20 percig. A feleslegben levő festéket 500 ml **9.** oldatban történő rázatással távolítjuk el (kb. 1-2 óra).

ENZIMOLÓGIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

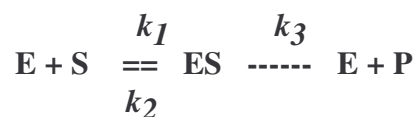
AZ ENZIMEK MŰKÖDÉSÉNEK ELMÉLETI ALAPJAI

Az élő sejtekben zajló kémiai átalakulások az ezek számára általában kedvezőtlenül kiegyenlített körülmények (pH, hőmérséklet, nyomás stb.) ellenére igen nagy sebességgel mennek végbe. Ennek magyarázata abban rejlik, hogy a sejtek majdnem kivétel nélkül minden ilyen átalakulást *specifikus biokatalizátorok*, az enzimek segítségével bonyolítanak le.

Ezekre az élő rendszerekben kulcsszerepet játszó fehérje természetű molekulákra jellemző, hogy csak egy adott anyag vagy anyagszóport (szubsztrát) átalakításában vesznek részt, tehát specificitást mutatnak, amiből eredően a sejtekben végbemenő nagyszámú reakció lebonyolítása ugyancsak nagy számú különböző enzimet igényel. Ezek közül számos szabályozás alatt áll, ami az anyagszerepfolyamatok kontrollálásának elengedhetetlen feltétele. A kémiai reakciók mellett az enzimek játszanak szerepet a sejtekben végbemenő energiaátalakítási folyamatokban is, említve például a fotoszintézist vagy a terminális oxidációt. Mindezen komplex folyamatok lezajlása végül is magas szervezetségű és nagy hatékonyságú enzimrendszerek meglétét tételezik föl.

A kémiai reakciók időbeli lefutását a reakciókinetika tudománya vizsgálja. Ezeket a folyamatokat a reakciósebességgel, azaz a keletkező termékek időegység alatt bekövetkező koncentrációváltozásával jellemezzük, ami egyensúlyra vezető reakciók esetében függ a kiindulási anyagok és végtermékek koncentrációjától, termodinamikai megfontolások miatt. Az enzimek nem képesek az adott egyensúlyi állapotok eltolására, hanem reakciósebesség növelő hatásukat az egyensúlyi állapotba jutás felgyorsításával érik el. Ez annak köszönhető, hogy a szubsztrátmolekula megkötésével, az annak szerkezetében létrehozott változások miatt csökken a szubsztrát és a termék kialakulásához vezető úgynevezett "átmeneti állapot" között fennálló szabadenergia különbség (ΔG^\ddagger), azaz a reakció *aktiválási energiája*.

Az enzimek által katalizált egyszubsztrátos reakciók sebességét sem az első rendű (egy kiindulási anyagos), sem pedig a másodrendű (két kiindulási anyagos) reakciók kinetikai leírása nem adja meg helyesen, hanem az enzimreakciók általános egyenlete Michaelis és Menten nyomán a következő:



ahol az E az enzimet, az S a szubsztrátot, P a terméket és ES az enzim-szubsztrát komplexet jelöli, a k_1 , a k_2 és a k_3 pedig a reakció elemi lépéseinek sebességi konstansai. A reakció első lépését az ES komplex kialakulása, azaz a szubsztrátnak az enzim aktív centrumához való kapcsolódása jelenti gyenge kémiai kötések útján (ennek sebessége k_1). Az enzimek aktív

centruma általában a fehérjemolekula kis hányadát teszi ki, és legtöbbször egy mélyedésben vagy árokban helyezkedik el az enzim felületén. Alakjának a szubsztráthoz való komplementaritása az, ami az enzimet az adott szubsztrátra irányuló specificitással ruházza fel. Az ES komplex egyrészt visszaalakulhat S-re és E-re (k_2 sebességgel), másrészt P-re és E-re alakulhat át (k_3). Ezen elemi lépések eredője hozza létre az úgynevezett "steady-state" állapotot, ami az ES komplex koncentrációjának időleges változatlanságát takarja, amit a reakció előrehaladtával S P-vé alakulása szünt meg, mivel a visszafelé vezető út aktiválási energiagátja általában magas.

A katalízis aktuális sebességét a szubsztrát és az enzim koncentrációjának függvényében a *Michaelis-Menten egyenlet* írja le:

$$V = V_{max} [S] / (K_M + [S])$$

ahol a maximális sebesség $V_{max} = k_3[E_0]$, $[E_0]$ pedig a teljes enzimkoncentráció ($[ES] + [E]$). Az egyenlet által meghatározott függvény alakja egy telítési görbének felel meg, ami az összes enzim molekula szubsztráttal való telítődése miatt maximális sebességhez (V_{max}) tart a szubsztrát koncentráció növekedésével. A K_M az úgynevezett Michaelis konstans, melynek jelentése az a szubsztrátkoncentráció, melynél $V = V_{max}/2$. Ez az elemi sebességi konstansokból épül fel a következőképpen.

$$K_M = (k_2 + k_3) / k_1$$

Ha $[S] \gg K_M$, akkor $V = V_{max}$, ha pedig $[S] \ll K_M$, akkor $V = (V_{max}/K_M)[S]$. A V_{max}/K_M paraméter az enzim katalitikus hatékonyságát jellemzi. A K_M konstans tájékoztatást ad az enzim szubsztráthoz való affinitásáról, azaz az ES stabilitásáról, mint annak disszociációs állandója. Ez azonban csak akkor áll fenn, ha $k_2 \gg k_3$ és ekkor $K_M = k_2/k_1$.

A V_{max} és a K_M kinetikai paraméterek kísérletes meghatározása úgy történik, hogy reakciósebességeket mérünk különböző szubsztrát koncentrációk mellett ($[S] = 0.5-5 K_M$). Az így kapott sebességi értékek reciprokát ($1/V$) a Michaelis-Menten sebességi egyenlet *Lineweaver-Burk-féle linearizált formájának* megfelelően a szubsztrát koncentrációnak a reciproka ($1/[S]$) függvényében ábrázolva egy egyeneshez jutunk, mely az

$$1/V = 1/V_{max} + (K_M/V_{max})(1/[S])$$

egyenlet alapján K_M/V_{max} meredekséggel és $1/V_{max}$ Y tengelyen fekvő metszésponttal jellemezhető, melyből a paraméterek kifejezhetők. Pontosabb eredményt ad a paraméterek *Foster-Niemann-féle nemlineáris illesztéssel* történő meghatározása.

Az enzimes katalízis sebességét (*enzimaktivitást*) az újonnan bevezetett jellemző SI egységek a *katal* (1 kat = 1 mol szubsztrát alakul át 1 s alatt), vagy hagyományosan a standard enzim egység (1 U = 1 mmol szubsztrát alakul át 1 perc alatt, 25 °C-on standard körülmények között). A *specifikus aktivitás* SI rendszerben használt egysége a *kat/kg* (1 kat/kg = 1 kg enzim 1 mol szubsztrát átalakítására képes 1 s alatt).

Az enzimreakciók lezajlását specifikus molekulák vagy ionok képesek gátolni, ami végeredményben fontos szerepet játszhat a biológiai rendszerek irányításában, másrészt gyógyszerek hatásmechanizmusában, vagy éppen mérgek hatástalanításában, valamint ezen keresztül lehetőség nyílik az enzimek hatásmechanizmusának megismerésére. A gátlási folyamat lehet nem megfordítható (*irreverzibilis*), amikor a gátló molekula (*inhibitor*, I) nem vagy csak nagyon lassan disszociál az enzimről (az EI komplex stabil, sokszor kovalens), vagy megfordítható (*reverzibilis*), ha ez a disszociáció viszonylag gyors (az EI komplexet nemkovalens kötések tartják össze). Irreverzibilis inhibitorok (inaktivátorok) közé tartoznak pl. az ideggázok (szerves foszforsavészterek), amelyek az idegi ingerület átviteli folyamatok szabályozásában fontos szerepet játszó acetilkolin észteráz enzim katalitikus csoportjával képeznek stabil észter kötést. Az olyan csoportspecifikus reagenseket is ide sorolhatjuk, amelyek a fehérjék bizonyos aminosav oldalláncait módosítva okoznak enziminaktivációt (jódacetamid - cisztein, szerin; dietilpirokarbonát - hisztidin stb.).

A reverzibilis inhibitorok több csoportra oszthatók. Az úgynevezett *kompetitív gátlók* specifikusan az enzim aktív centrumához kapcsolódnak a szubsztrát molekulához való szerkezeti analógiájuknál fogva. Gátló hatásukat a szubsztrát bekötődésének akadályozásával érik el, ami az [ES] csökkenéséhez vezet, tehát csökken a komplex stabilitása ($1/K_M$ csökken), V_{max} -ra viszont nincs hatásuk. A kompetitív elnevezés az aktív centrumért való versengésre utal az inhibitor és a szubsztrát között. Az [S] növelésével a gátló hatás visszaszorítható.

A másik fő csoportba a *nem kompetitív inhibitorok* tartoznak. Ezek a molekulák nem az aktív centrumhoz, hanem az enzim más helyéhez kapcsolódva az enzimes katalízis sebességét (V_{max}) csökkentik, míg az [ES]-ra nincs hatásuk. Ezek az inhibitorok nem szoríthatók le a szubsztrátkoncentráció növelésével az enzimről.

A kétféle gátlástípus kinetikailag egyértelműen elkülöníthető egymástól a *Lineweaver-Burk* vagy a *Dixon-féle linearizáció* segítségével. Ha változó szubsztrátkoncentráció mellett, az inhibitor hiányában majd jelenlétében mért reakciósebességek reciprokát ($1/V$) ábrázoljuk az $1/S$ függvényében, akkor a kapott egyenesek metszéspontja kompetitív gátló hatás esetén az $1/V$ tengelyen (Y) található, mivel V_{max} nem változik, csak K_M , míg nem kompetitív inhibíciónál az $1/S$ tengelyre (X) esik, mert ekkor V_{max} csökken. Az inhibitorok enzimhez viszonyuló affinitását az inhibíciós konstans (K_I) fejezi ki, ami az EI komplex stabilitását jellemző disszociációs állandó. Ennek közvetlen meghatározása a Dixon-féle linearizáció alkalmazásával lehetséges, melynek során változó szubsztrát és inhibitor koncentrációk mellett mért reakciósebességek reciprokát ($1/V$) ábrázoljuk az inhibitor koncentráció függvényében ([I]). A kapott egyenesek metszéspontjának az X tengely negatív tarományára eső vetülete adja a $-K_I$ értékét.

Az enzimek működésének sebessége mindig függvénye a fennálló körülményeknek (pH, hőmérséklet, ionerősség, ionmiliő). Az enzimaktivitás *hőmérsékletfüggését* a kémiai reakciók termodinamikai leírása alapján értelmezhetjük és az Arrhenius egyenlettel írhatjuk le:

$$k=Ae^{-E/RT}$$

ahol k a reakciósebesség, A konstans, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, E pedig a reakció aktiválási energiája. A hőmérséklet emelésével az enzimreakciók sebessége általánosságban növekszik. Ez azonban csak egy határig igaz (hőmérsékleti optimum), mivel az enzimek szerkezetén belül a polipeptid lánc és az oldalláncok mozgékonyasága is a hőmérséklettel összefüggésben nő, és így egy szinten túl a fehérjemolekula aktivitásához elengedhetetlen rendezett struktúra fokozatosan megszűnik az azt stabilizáló kötések felbomlása miatt.

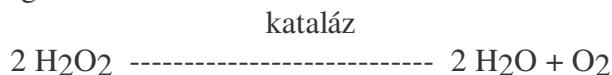
Az enzimreakciók sebességének *pH-függése* is általában optimumgörbét (haranggörbét) mutat több tényezőtől eredően. Ezek közül az egyik akkor lép érvénybe, ha a kérdéses enzim disszociálisan csoportokat (glutamát, aszpartát, hisztidil stb.) alkalmaz a katalízis lebonyolításában, melyek állapota pH-függő (pl. glikozid hidrolázok, β -laktamázok stb.) Másrészt a pH az enzim natív struktúráját befolyásolhatja az azt fenntartó kölcsönhatásokban résztvevő oldalláncok állapotára hatva. Harmadszor pedig a szubsztrátok és/vagy koenzimek disszociációs állapotára is hatása lehet. Mindazonáltal, az enzimek pH-függési görbéi eltérést mutatnak: széles tartományban vagy szűkben mutatnak optimumot vagy csak az egyik pH tartományban korlátozottak.

Egyéb környezeti feltételt jelenthet azoknak az anyagoknak (ionok, kofaktorok) a jelenléte, amelyek bizonyos enzimek működéséhez elengedhetetlenek (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , NAD^+ , FAD stb.).

Az enzimek működési mechanizmusa többlépcsős folyamat. A reakciókinetikai vizsgálatok (V_{max} , K_M , K_I , k_1 , k_2 , k_3 stb. meghatározása) során megismerjük az enzim szubsztrátspecifitását és inhibíciós tulajdonságait különböző természetes és szintetikus vegyületek felhasználásával. Mindezek információkkal szolgálnak az enzim aktív centrumának általános szerkezetéről (hidrofóbitás, ionos csoportok jelenléte, szubsztrát és inhibitor kötésének mechanizmusa). Továbbmenve, a katalízis hőfüggéséből a reakció energetikai viszonyaira, a kinetikai paraméterek (V_{max} , V_{max}/K_M , K_M) pH-függéséből pedig a disszociálisan katalitikus oldalláncok savi disszociációs állandójára következtethetünk. Ezeknek az aktív aminosav oldalláncoknak a típusát specifikus kémiai ágensek hatásának kinetikai analízisével állapíthatjuk meg; radioaktívan jelzett aktív centrum specifikus irreverzibilis (affinity label, mechanizmus alapú) inaktívátorok alkalmazásával pedig lehetővé válhat ezen kulcsfontosságú aminosavak milyenségének, valamint helyének meghatározása a fehérje aminosav sorrendjében. Mindezen információk a röntgenkrisztallográfiás és más szerkezetfeltáró módszerekből nyert ismeretekkel ötvözve vezetnek el az enzimek működésének megértéséhez és alapot biztosítanak ezen biokatalizátorok gyógyászati, ipari és mezőgazdasági szempontok szerinti átalakításához a molekuláris biológia eszköztárának felhasználásával.

I. NÖVÉNYI KATALÁZ VIZSGÁLATA

A katalázt kisebb vagy nagyobb mennyiségben a szervezet összes szöveteiben és nedveiben megtalálhatjuk. Az emberi és állati vörösvértestek nagy mennyiségű katalázt tartalmaznak. Az enzim a növényi szövetekben is igen elterjedt, s a peroxiszómaiban lokalizálódik. Funkciója a mérgező hidrogénperoxid bontása, ami in vitro a következő egyenlet szerint megy végbe:



A szervezetben elsősorban a flavoproteinek oxidatív működése kapcsolatos peroxid képződéssel. Egy adott szövetben vagy folyadékban jelenlévő kataláz mennyisége az általa elbontott H_2O_2 vagy a reakcióban felszabadult O_2 mennyiségéből meghatározható.

A gyakorlaton duzzasztott kukoricaszemekből nyerjük a katalázt és aktivitását az el nem bontott H_2O_2 mennyiségének meghatározásával követjük nyomon. Az el nem bontott H_2O_2 -t permanganometriás visszatitrálással határozzuk meg:



Eszközök: dörzsmozsár
 mérőhenger 50 ml-es
 pipetták
 tölcsér
 Erlenmeyer lombikok (100 ml-es)

Anyagok: növényi minta
 kvarchomok
 foszfát puffer pH= 7,0-es (Sørensen)
 0,5 %-os H_2O_2 (frissen készítendő)
 0,001M KMnO_4
 10 %-os kénsav

Feladat:

A vizsgálandó növényi minta előkészítése:

Mérjünk le kb. 2 g duzzasztott kukoricaszemet és porcelán mozsárban 1 g kvarchomokkal és 50 ml pH 7,0 foszfát pufferrel több részletben alaposan dörzsöljük el. A kapott pépet szűrjük le, s az így nyert szűrletet használjuk a kísérletekhez.

Állítsuk össze a következő kísérletet:

Két 100 ml-es Erlenmeyer lombikba mérjünk 2-2 ml növényi kivonatot, 20-20 ml pH 7,0-es foszfát puffert és 26-26 ml desztillált vizet. A lombikokat hűtsük le 0-2 °C-ra. (így elkerüljük az ugyanilyen hatásmechanizmusú peroxidáz működését). A kívánt hőmérséklet elérése után az egyik lombikba 2 ml szubsztrát oldat (0,5 %-os H_2O_2) hozzáadásával elindítjuk az enzimreakciót. A 2 ml szubsztrát hozzáadása után azonnal vegyünk ki 5 ml

reakcióelegyet és adjuk az előre elkészített 10 ml 10%-os kénsavat tartalmazó titráló lombikba, majd 0,001M KMnO_4 -tal titráljuk maradandó rózsaszín színig kénsavas közegben. 10 percenként vegyünk ki 5 ml-t a reakcióelegyből és titráljuk KMnO_4 -tal az előbbiek szerint. A másik lombikot kontrollként használjuk.

Végezzünk számításokat:

Számoljuk ki a kataláz által 10, 20, 30, 40, 60 és 90 perc alatt elbontott H_2O_2 mennyiségét. Számításunknál vegyük figyelembe a kontroll értékét! (1 ml 0,001 M KMnO_4 mérőoldat 0,085 mg H_2O_2 -dal egyenértékű).

II. TIROZINÁZ ENZIM KIMUTATÁSA BURGONYA HÁJÁBAN

A tirozináz (polifenoloxidáz) olyan rézionokat tartalmazó oxidáz, amely az L-tirozint a levegő oxigénjének felhasználásával a *melaninok* bioszintézisében fontos szerepet játszó dopakinonná alakítja. Többfunkciós enzim: *fenoláz* (EC 1.10.3.1) aktivitása segítségével a tirozinból 3,4-dihidroxi-fenilalanint (DOPA) készít, amelyet *polifenol-oxidáz* (EC 1.14.18.1) aktivitásával dopakinonná oxidál. Számottevő mennyiségben fordul elő a burgonyában, különösen annak héjában.

Eszközök: Dörzsmozsár,
Kés,
üvegtölcsér,
Kémcsövek, lombikok, pipetták
37 °C-os vízfürdő,
centrifuga,

Anyagok: Burgonyahéj,
L-Tirozin oldat: 0,10 g L-tirozint ($M=181,19$ g) enyhe melegítéssel 200 ml
5 %-os vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldatban oldunk, majd az oldatot lehűtjük.

Feladat:

A burgonyahéjból 5 g-ot apróra vágunk, előbb magában, majd 10 ml desztillált vízzel dörzsmozsárban pépesre dörzsöljük, a keletkezett elegyet 5000 fordulatszámon 10 percig centrifugáljuk. A felülúszó tartalmazza az enzimet. A burgonyahéj kivonatban található tirozináz enzim jelenlétét színreakcióval mutatjuk ki, mivel a képződő melanin az elegyet megsötétíti. Két kémcsőbe 3-3 ml L-tirozin oldatot pipetázunk és rendre 2,5 ml illetve 2 ml desztillált vizet adunk hozzá, majd rendre 0,5 és 1,0 ml felülúszót (burgonyahéj-kivonat) öntünk hozzá és a kémcső tartalmát erősen összerázzuk. A reakcióelegyet 1 óra hosszat 37 °C-os vízfürdőben inkubáljuk. Az oxigén könnyebb bejutása érdekében a kémcsöveket 5 percenként összerázzuk. Az inkubálás közben 15 percenként megfigyeljük a kémcsövek tartalmának színváltozását. 15 percenként 1 ml oldatot 1 ml desztillált vizet tartalmazó küvettaiba pipetázunk majd mérjük az abszorbanciát 475 nm hullámhosszon spektrofotométerrel.

Készítsünk táblázatot a tirozin oldatok színváltozásáról, valamint a kétféle hígítású tirozináz oldat aktivitásáról. Ábrázoljuk az idő függvényében a mért abszorbanciákat, és értelmezzük a kapott görbéket.

III. α -AMILÁZ AKTIVITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA

A keményítő enzim hidrolízise árpa eredetű amiláz enzimmel

A keményítő glükóz egységekből álló, α -glikozidos kötéseket tartalmazó poliszacharid. A poliszacharid molekulák túl nagyok a felszívódáshoz, ezért a keményítő 1,4-glikozidos kötéseit az emésztés során, de a növényi és mikrobiális sejtekben a tartaléktápanyagként való felhasználáskor is az amiláz enzimek hasítják. Ez a folyamat jelentős a csírázó gabona magvakban, ahol ezért a csírázás során amiláz enzimek is termelődnek. Az α -amiláz endo-hidroláz, a lánc belső részében a glikozidos kötéseket véletlenszerűen hasítja, a β -amiláz exo-hidroláz, a nem redukáló láncvégről maltóz egységeket hasít le.

A reakció nyomon követése (az enzim aktivitás mérése) megvalósítható a keletkező termék detektálásával, vagy a szubsztrát elfogyásának mérésével. A gyakorlat során a szubsztrát koncentrációjának csökkenésével követjük az enzim reakciót. A keményítő jóddal sötétkék színreakciót ad. A glükóz egységekből felépülő keményítő hidrogénhidakkal stabilizált helikális, azaz spirálalakú amilózlánca ugyanis csőszerű szerkezetet alkot, ami a jódmolekulákat zárvány formájában, adszorpciós komplexként képes megkötni, ez okozza a kék elszíneződést. A kék szín intenzitása 620 nm hullámhosszon, spektrofotometriásan meghatározható. Melegítéskor a jódmolekulák kidiffundálnak az amilóz apoláros üregeiből, ezért a kék szín eltűnik, lehűléskor a komplex ismét kialakul, a kék szín megjelenik. Az α -amiláz működésének eredményeképpen keletkező hosszabb molekulájú dextrinek a jóddal barnászörös színt mutatnak. A keményítő teljes lebomlása után az elegy jóddal nem ad színreakciót.

Eszközök: Kémcsövek,
pipetták,
mérőhengerek,
redős papírszűrő,
főzőpohár,
37 °C-os vízfürdő

Anyagok: 1 %-os desztillált vizes keményítőoldat,
Lugol-oldat (kálium-jodidos jóddoldat): 1 g KI + 1 g I₂ 100 ml desztillált vízben oldva.

Feladatok:

Enzimpreparátum készítése árpa csíranövényből:

Mérőhengerrel kimérünk 30 ml desztillált vizet. 2 g 4-5 napos árpa csíranövényt kevés desztillált vízzel, dörzsmozsárban kvarchomokkal eldörzsölünk, majd hozzáadjuk a mérőhengerből a maradék vizet és homogenizáljuk. 6000-szeres percenkénti fordulatszámon 10 percig centrifugáljuk.

A gyakorlat menete:

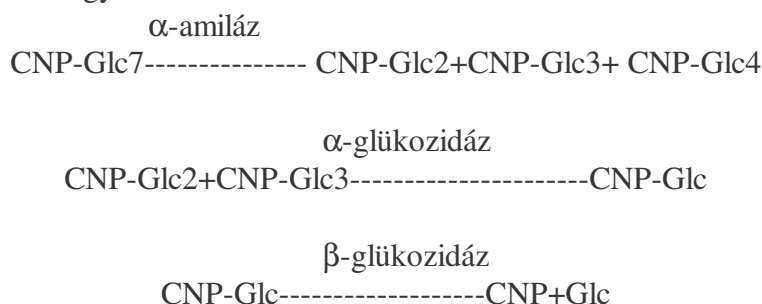
10 db kémcsövet sorszámmal látunk el és bennük a csírázó árpából készített kivonatból hígítási sorozatot készítünk. Mindegyik kémcsőbe belepipettázunk 2-2 ml desztillált vizet. Az 1. kémcsőbe 2 ml enzim oldatot pipettázunk, a kémcsövet jól összerázzuk, majd a kétszeresére hígított kivonatból 2 ml-t a 2. kémcsőbe pipettázunk, és így végig mindegyikbe elkészítjük a felező hígítást. Mindegyik kémcsőbe 2-2 ml 1 %-os keményítőoldatot pipettázunk, a kémcsövek tartalmát összerázzuk, majd fél óra hosszat 37 °C-os vízfürdőbe helyezve inkubáljuk. Az inkubációs idő lejártá után mindegyik kémcsőbe 30 ul Lugol-oldatot cseppentünk és a kémcsöveket összerázzuk. A kapott elegyek abszorbanciáját 620 nm hullámhosszon meghatározzuk.

Az észleléseket táblázatba jegyezzük fel és értékeljük a változásokat! Állapítsuk meg, hogy hányszorosára hígítható az enzimmennyiség hatékonyságának számottevő csökkenése nélkül! Milyen hígításnál észlelhető dextrinek keletkezése? Milyen hígítástól alkalmatlan az enzimmennyiség a keményítő hidrolízisére?

Szérum amiláz szint meghatározása amiláz kit segítségével

A humán α -amilázok jól ismert és széleskörűen tanulmányozott enzimek. A három vagy több glükóz egységből $\alpha(1-4)$ kötéssel felépülő glükánokat hidrolizálják, így a keményítőt tartalmazó táplálékaink lebontásában vesznek részt. Az α -amiláz biológiai folyadékokban történő meghatározása igen fontos klinikai teszt a hasnyálmirigy eredetű betegségek diagnosztizálásában.

Számtalan módszer ismeretes az amiláz aktivitásának meghatározására. Az amiláz természetes szubsztátjait - a maltodextrineket és keményítőket - alkalmazó módszereket azonban napjainkban már kiszorították a szintetikus szubsztátokat felhasználó "amiláz kitek". Bár a különböző tagszámú kromogén aglikonnal kapcsolt maltooligomer glikozidokat, mint szubsztátokat alkalmazó kitek segédenzimekkel működnek, mégis lineáris reakció kinetikát mutatnak, rövid idő alatt kivitelezhetőek. A hazai klinikai laboratóriumokban széleskörűen használják a Merck GRANUTEST amiláz kitjét, amely a szérum / vizelet és nyál α -amiláz aktivitásának meghatározására szolgáló reagens készlet. A meghatározás a 2-klór-4-nitrofenil- β -maltoheptaoid (CNP Glc 7) hasításán alapul és segédenzimként α - és β -glükozidázt használ. Az amiláz kit egyszerűsített elve:



Az α -amiláz hidrolizálja a heptamert kisebb tagszámú oligomerekké. Ezt követően az α -glükozidáz, mint exoglükozidáz glükózt hasít le a láncok nem redukáló vége felől és a monomer (CNP-Glc1) képződését eredményezi.

A β -glükozidáz a 2-klór-4-nitrofenolt (CNP) szabadítja fel, ami 405 nm-nél spektrofotometriásan detektálható. A CNP képződésének a sebessége közvetlenül arányos a vizsgált minta α -amiláz aktivitásával.

Eszközök: UV/VIS fotométer (GBS 911/A)
stopper
küvetták
automata pipetták

Anyagok: *Amiláz kit:* A Biokémiai Tanszéken készült, azonos a Merck kittel.
Három edényben van kiszerve: 1. Segédenzimek
2. Szubsztrát
3. Puffer

A kit összetevőinek koncentrációja a tesztben: α -glükózidáz , 80 U/ml; β -glükózidáz, 2,5 U/ml; foszfát puffer pH= 6,8, 50 mmol/l; KCl ,50mmol/l ;2-klór-4-nitrofenil- β -maltoheptaoid, 1,5 mmol/l.

Vizsgálati minta: szérum / vizelet

Reagensek: A reagens oldatok elkészítéséhez a segédenzimeket (1) 25 ml pufferben, a szubsztrátot (2) 3 ml pufferben oldjuk fel. Feloldódás után tartjuk az oldatokat hűtőszekrényben a felhasználásig. A munkaoldathoz az 1. és 2. reagenst 10:1 arányban elegyítjük.

Feladat:

Diagnosztikus szérum minták, valamint kontrol szérum aktivitásának meghatározása:

Mérjük kémcsőbe 3-3 ml előkészített munkaoldatot és 5 percig tartjuk 25 °C- on. Adjunk hozzá 0,06 ml szérumot. Jól keverjük össze és inkubáljuk a mérési hőfokon 3 percig. Mérjük meg a kezdeti abszorbancia értéket 405 nm-en és ezt követően 5 percen át az abszorbancia érték percenkénti változását.

Ha a percenkénti változás nagyobb 0,2-nél, higítsuk a mintát fiziológiás konyhasó oldattal és az eredményt ennek megfelelően számoljuk.

Számítás:

Számoljuk ki a diagnosztikus szérum minták amiláz aktivitásait és vessük össze az eredményeket a kontrol szérum értékével:

$$\text{amiláz (U/L)} = \Delta A / \text{perc} \cdot c$$

$$(c = 4595, 25 \text{ és } 30^\circ\text{C-on})$$

(Normál értékek: 120 U/L 25 °C-on és 160 U/L 30 °C -on)

Mivel a nyál és a verejték nagy mennyiségben tartalmaz α -amilázt, így a mérés során kerülni kell a szájjal történő pipettázást és a vegyszerek kézzel érintését.

ZSIROK EMÉSZTÉSE, AZ EPE VIZSGÁLATA

I. Zsírok emésztése

A zsírok emésztése jelentéktelen mértékben a gyomorban kezdődik, de főleg a duodénumban folyik a lipáz enzim hatására. A pankreásznedv részben aktív, részben inaktív lipázát a hasnyálmirigy termeli. Az inaktív lipázt az epe aktiválja. A pankreáslipáz egyaránt aktív lúgos, neutrális és savanyú közegben. A bélnedv szintén tartalmaz lipázt. A lipáz hatására a zsírok vízfelvétel mellett mono-gliceridre és zsírsavakra hasadnak. Szubsztrátként a tej igen alkalmas, ugyanis emulgeált zsírt tartalmaz.

1. Tejzsír emésztése hasnyálmirigy lipázzal

Eszközök: 4 db 250 ml-es Erlenmeyer lombik
50 ml-es mérőhenger
vízfürdő
2- és 10 ml-es pipetta
porcelánmozsár
olló
állvány és kémcsövek

Anyagok: friss hasnyálmirigy vagy szárított pankréász por
vizes glicerinnel oldat (3 térfogat víz, 1 térfogat glicerinnel)
felforralt majd lehűtött tej
fenoftalein
0,1 M NaOH

Feladat:

Glicerinnel lipázaktivitás vizsgálata:

A hasnyálmirigyet megtisztítjuk a zsírtól. A megtisztított pankréázt felaprózzuk és 5 g-ot (vagy 0,5 g pankréászport) mozsárban 10 ml vizes glicerinnel összekeverünk. A mozsár tartalmát 4-5 percig dörzsöljük. A keveréket vattán át kémcsőbe szűrjük.

Egy kísérlethez 4-5 ml szűrt kivonat elegendő. A nyert szűrletből 2-2 ml-t két kémcsőbe pipettázunk. Az első csőben levő kivonathoz 2-3 csepp epét adunk a lipáz aktiválására.

Tejzsír emésztése:

Két Erlenmeyer lombikban végezzük a tejzsírok emésztését aktivált és nem aktivált lipázzal: mérőhengerrel 50-50 ml tejet mérünk két Erlenmeyer lombikba majd a hőmérséklet felvétele céljából 10-15 percre 37°C-os vízfürdőbe állítjuk őket. A reakció indítása az aktivált illetve nem aktivált pankréáskivonat hozzáöntésével történik. A lombikokat ezután 37°C-on tartjuk. 0, 15, 30 és 45 peckor mindkét emésztési elegyből 10-10 ml-t pipettázunk egy 10 ml desztillált vizet és pár csepp fenoftaleint tartalmazó lombikba, s a mintákat 0,1 M NaOH oldattal megcseppentjük. A titráshoz szolgáló lombikokat az enzim hozzáadása előtt előkészítjük, hogy a 0-perces érték titrálását haladéktalanul megkezdhesük. Hasonlóképpen járunk el a különböző időpontokban titrálandó mintákkal is. A különböző időpontokban vett minták titerét az idő

függvényében ábrázolva szemléltetjük a zsír hidrolízisének időbeli lefolyását az aktivált és nem aktivált pankreász kivonattal. A kísérlet demonstrálja, hogy milyen nagy jelentőségű az epe a zsír emésztésében még olyan finoman emulgeált zsír esetében is, mint a tejzsír. Egyéb zsírok emésztésében még nagyobb szerepe van, mert nemcsak a lipázt aktiválja, hanem a zsírt is emulgeálja.

2. Lipáz kvantitatív meghatározása

A lipáz a zsírokat monogliceridre vagy glicerinre és zsírsavakra hidrolizálja. Ha a keletkezett zsírsavakat lúggal titráljuk, akkor az elfogyott lúg mennyiségéből következtethetünk az elbontott zsírra és ebből a lipáz aktivitására. A lipáz aktivitása epe hozzáadására jelentékeny mértékben nő. Ezt a következő módszer segítségével mutatjuk ki.

Eszközök: Erlenmeyer lombik
pipetta
vízfürdő
hőmérő

Anyagok: glicerines lipázkivonat
napraforgó olaj
epe (1:5 hígítású)
0,1 M NaOH
fenoftalein idikátor

Feladat:

Négy lombikot a következőkkel töltünk meg:

	Oldatok (ml)			
Lombikok száma	1	2	3	4
Desztillált víz	3	3	2	3
Napraforgó olaj	2	2	2	2
Lipázkivonat	1	-	1	-
Felfőzött lipázkivonat	-	1	-	-
Epe	-	-	1	1

Mindegyik lombikba 2 csepp fenoftaleint adunk és gondosan összerázzuk, majd 0,1 M lúggal gyenge rózsaszín elszíneződésig titráljuk. Mind a négy lombikot egyidőben 37-38°C-os vízfürdőbe helyezzük. 30 perc múlva a lombikokat kivesszük a vízfürdőből és 0,1 M lúggal cseppenként ismét rózsaszín elszíneződésig titráljuk. Így megállapíthatjuk a lipáz hatására keletkezett zsírsavak neutralizálásához szükséges lúgmennyiséget, cseppekben.

II. Az epe vizsgálata

Az epét a májsejtek választják ki. Az epe az epehólyagban gyűlik össze és a duodenumba ürül. Az epének fontos szerepe van az emésztésben és a felszívódásban. A zsírok emésztése és felszívódása epe hiányában nem megy végbe.

Egyes megbetegedések közös tünete a sárgaság. Ilyenkor a normálisnál nagyobb mennyiségű epefesték kering a vérben. Intoxikációt okoz a szervezetben, a bőrt jellegzetes sárgára színezi. Ezért a klinikumban nagy jelentősége van az epefestékek és epesavak meghatározásának a vérben és a vizeletben.

Az epe a következő alkatrészekből áll: epesavak sók alakjában, epefestékek, koleszterin, lecitin és néhány más vegyület.

1. Epefestékek reakciói:

Az epefestékek kimutatása azon alapszik, hogy a bilirubint oxidálva különböző színes bilirubin-származékokat nyerünk, így a zöld biliverdint, a kék bilicianint, a sárga koetelint, stb.

Eszközök: kémcsövek állvánnyal
üvegtölcsér, üveglap

Anyagok: epe
koncentrált salétromsav (salétromossav nyomait tartalmazó)
10%-os szódaoldat
3%-os kalciumklorid
etilalkohol

Feladat:

a.) Gmelin-próba:

Kémcsőbe kb. 1 ml desztillált vízzel ötszörösére hígított epét öntünk és óvatosan alárétegezzük 1 ml koncentrált salétromsavat. A folyadékok határán epesav- és fehérje-csapadék, valamint színes epefesték-gyűrűk keletkeznek. A jellegzetes zöld, kék, ibolya, vörös és sárga gyűrűk az epefestékek különböző mértékben oxidálódott termékeinek felelnek meg.

b.) Szűrőpapír próba:

Az epét szűrőpapíron ismételten átszűrjük. A szűrőpapír az epefestéket még híg oldatból is adszorbeálja. Ha a szűrőpapírt egy üveglapon kiterítjük és a közepére koncentrált salétromsavat cseppentünk, akkor a csepp körül epefesték-gyűrűk jelennek meg. A zöld gyűrű kívül helyezkedik el.

c.) Huppert-Szalkovszkij próba:

Kémcsőbe kb. 5 ml ötszörösére hígított epét öntünk, majd kb. 2 ml 10%-os szódaoldatot és kb. 2 ml 3%-os kalciumklorid-oldatot adunk hozzá. Sárga csapadék válik ki, amely az epefestékek kalcium -hidroxiddal alkotott vegyületei. A csapadékot leszűrjük és vízzel átmoszuk, majd sósavval megsavanyított 5-6 ml alkoholban oldjuk. Ezután hozzáadunk 1 csepp ferrikloridot és főzzük, zöld vagy kékeszöld színeződés keletkezik.

2. Epesavak reakciói:

Az epesavak közül a legfontosabb a glikokólsav és taurokólsav, melyek a koleszterin lebomlásának termékei. Egy bonyolult reakciósorozatban a koleszterinből először kólsav képződik. A kólsav és származékai elsősorban az epében fordulnak elő. A glikokólsavban és a taurokólsavban savamid kötéssel glicin vagy taurin kapcsolódik a kólsav karboxilcsoportjához. Az epe alkálikus pH értékén anionformákban találhatók, mint kolát, taurokolát és glikokolát.

Az epesavak kimutatására szolgál többek között a Pettenkoffer-próba és a felületi feszültség próba.

A Pettenkoffer-reakció lényege az, hogy a szacharóz koncentrált kénsav hatására hidroximetil-furfurollá alakul át, amely a kólsavval színes vegyületet képez.

A felületi feszültség próba azon alapszik, hogy az epesavak csökkentik a folyadékok felületi feszültségét. A próba igen érzékeny, az epesavak még 1:120.000-szoros hígításban is kimutathatók.

Eszközök: kémcsövek állvánnyal
pipetták

Anyagok: epe
10%-os szacharóz oldat
tömény kénsav
kénvirág

Feladat:

a.) Pettenkoffer-reakció:

Kémcsőbe kb. 5 ml desztillált vízzel ötszörösére hígított epét öntünk. Keverés közben 1-2 csepp szacharóz oldatot adunk hozzá. Óvatosan 1-2 ml tömény kénsavat rétegzünk alá. Az érintkezési felületen vöröses-ibolya színű korong keletkezik. Ha a kémcső tartalmát hűtés közben óvatosan összerázzuk, az egész folyadék bíborszínű lesz.

b.) Felületi feszültség próba:

Vegyünk 3 kémcsövet: Az elsőbe kémcsőbe 10 ml desztillált vizet, a másodikba 10 ml vízzel erősen hígított epét (víz:epe / 5:1), a harmadikba pedig 10 ml vízzel gyengén hígított epét (víz:epe / 1:0,5) adjunk. Hideg vízzel hűtsük le mind a három kémcső tartalmát. A folyadékok felületére kénvirágport hintünk. A kénpor a tiszta víz felületén marad. Az erősen hígított epében lassan, a gyengén hígított epében pedig lényegesen gyorsabban süllyed le a kénpor a kémcső fenekére, mivel az epesavak csökkentik a víz felületi feszültségét.

AZ ACETIL-KOLIN ÉSZTERÁZ VIZSGÁLATA

A kolin észterázok az élő szervezet szinte valamennyi szövetében kimutathatók, amelyek valamilyen kapcsolatban állnak az ingerületi folyamattal. Két típusu kolin észteráz különíthető el enzimológiai tulajdonságuk, működésük, valamint lokalizációjuk alapján:

1.) Valódi vagy acetil-kolin észteráz (acetil- kolin hidroláz), amely a vörösvértestekben és a trombocitákban fordul elő.

2.)Pseudo- kolin észteráz (acil-kolin hidroláz), amely főleg a plazmában található.

A kétféle enzim különféle aktivitást mutat a különféle kolin észterek hasításában. A valódi kolin észteráz az acetil-kolint sokkal gyorsabban hidrolizálja, mint más kolin észtereket ezért acetil- kolin észteráznak is szokás nevezni. A pseudo-kolin észteráz viszont a butiril- és propionil-kolint hidrolizálja nagyobb sebességgel. A kétféle enzim között jelentős különbség van a szubsztrát iránti érzékenységet illetően is. A valódi kolin észteráz esetében, ha az acetil-kolin koncentrációt egy optimumon túl emeljük, szubsztrátgátlást észlelünk, míg a pseudo-kolin észteráz aktivitása a szubsztrátkoncentráció emelésével állandóan nő, szubsztrátgátlás nem észlelhető. A két enzim különböző érzékenységet mutat az egyes inhibitorokkal szemben is. Mindkét enzim az idegrendszer különböző területein is megtalálható, bár itt elsősorban az acetil- kolin észteráznak van jelentősége. Az acetil-kolin gyors hidrolízise az idegműködés folyamatossága szempontjából alapvető fontosságu. Az acetil- kolin észteráz katalitikus mechanizmusa hasonló a kimotripszinéhez. Az acetil-kolin az enzim aktiv centrumában található szeril-oldalláncsal reagál és kovalens acetil-enzim intermediert hoz létre, miközben kolin szabadul fel. Az acetil -enzim intermediert ezután reagál a vízzel, ami acetátot eredményez és regenerálja a szabad enzimet.

Kolinészterázok meghatározásának módszerei:

- 1.) Ellman reakció: acetil-tiokolint használ szubsztrátként és a reakció során felszabaduló -SH csoportokat méri fotometriásan.
- 2.)Hestrin módszer: Főlölslegben adagolt acetil- kolin mennyiségének fotometriás visszamérését végzi színreakció után.
- 3.)Más eljárások: Az enzimreakció során felszabaduló ecetsav által létrehozott pH változások mérésén alapulnak.

A gyakorlat során a szérum kolin észteráz meghatározása Hestrin módszerrel történik. A meghatározás alapja: az enzimreakció során visszamaradó acetil-kolin acil-gyökéből képződött hidroxamát Fe(III) ionokkal adott reakciója. Igen elterjedt módszer. Hátránya az, hogy a visszamaradó szubsztrát koncentrációját méri, így kinetikai vizsgálatokra nem alkalmas.

Aktivitás mérése:

Megfelelően hígított szérumoldatokhoz pipetázzunk adott mennyiségű acetil-kolin oldatot. Egészítsük ki a térfogatokat 5 ml-re és helyezzük a kémcsöveket 37 °C-os vízfürdőbe. Pontosan 30 perc inkubálás után a kémcsöveket vegyük ki a vízfürdőből és mérjük mindegyikbe 2-2 ml lúgos hidroxilamin oldatot. 1 perc múlva adjunk mindegyik kémcsőhöz 1-1 ml HCl-víz oldatot, majd 1 ml FeCl₃ oldatot. Tíz perc állás után 530 nm-nél fotometráljuk az oldatot reagens vakkal szemben. A reagens vak 5 ml puffert és a reagenseket tartalmazza.

Eszközök: kémcsövek, kémcsőállvány
pH-mérő
termosztát
pipetták (1, 2, 5, 10 ml-es)
fotométer
mérőhenger (25 ml-es)

Anyagok: szérum (25-szörös hígításban)
0,1 %-os acetil-kolin
1M hidroxilamin
2M NaOH
cc. HCl
0,1M HCl
0,1 M glicin
0,1M NaOH
1M ecetsav
1M NaOH
0,1M citromsav

Reagensek: 1M hidroxilamin: 2M NaOH = 1:1,
cc. HCl : H₂O = 1:2,
10 % FeCl₃ (0,1M HCl-ban),
0,1M glicin- NaOH puffer (pH=8,4)

Feladat:

1. Kalibrációs görbe felvétele:

Pipetázzunk kémcsövekbe 0,2: 0,4: 0,6: 0,8: 1: 1,5: 2,0 ml 0,1 %-os acetil-kolin oldatot. Egészítsük ki mindegyik kémcső térfogatát pH=8,4 puffer oldattal pontosan 5 ml-re. Adjuk hozzá a reagenseket "Az aktivitás mérése" c. részben leírtak alapján, a megadott sorrendben és mennyiségben.

Tíz perc múlva fotometráljuk az egyes kémcsövek tartalmát a reagens vakkal szemben 530 nm-nél. A kapott abszorbancia értékeket ábrázoljuk az acetil-kolin koncentrációjának függvényében. Állapítsuk meg az aktivitásméréshez optimális szubsztrát koncentrációját.

2. A reakciósebesség függése az enzim koncentrációtól:

Állítsuk össze kémcsövekbe az alábbi reakcióelegyeket:
A vérszérumot 25-szörös hígításban használjuk! Az enzimreakciót a szubsztrát oldat hozzáadásával indítjuk.

	Oldatok (ml)						A_R	A_V
Kémcsövek	1	2	3	4	5	6	7	8
Szérum	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	-	-
Puffer	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	5,0	4,0
Acetil kolin	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	1,0

Helyezzük a kémcsöveket 30 percre 37°C-os termosztátba. Termosztálás után az alábbi oldatokat adjuk a kémcsövek tartalmához:

Lúgos hidroxilamin	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
cc.HCl:viz	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10%-os FeCl ₃	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Tíz perc állás után fotometráljuk az egyes kémcsövek tartalmát a reagens vakkal szemben 530 nm-en . Jegyezzük fel a mért abszorbancia értékeket. A mérési eredményeinkből készítsünk táblázatot a következő módon:

kémcső	A_P	$A_V - A_P$	acetyl -kolin (mg)	V(mg/perc)
--------	-------	-------------	--------------------	------------

Ábrázoljuk a reakciósebességet a szérumtérfogat függvényében!

A_V = szubsztrát vak abszorbanciája

A_P = az egyes próbákra kapott abszorbancia értékek

3. A pH hatása az enzim aktivitására:

Állítsuk össze az alábbi reakcióelegyeket:

Kémcsövek száma	1	2	3	4	5	6	7
Puffer pH-ja	4	5	6	7	8	9	10
	Oldatok (ml)						
Puffer	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Szérum	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Szubsztrát	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

A kémcsöveket 30 percre helyezzük 37°C-os vízfürdőbe, majd pipettázzuk a kémcsövek tartalmához az alábbi oldatokat.

Lúgos hidroxilamin	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
HCl: víz (1:1)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10%-os FeCl ₃	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Olvassuk le az abszorbancia értékeket a reagens- vak oldattal szemben.
Készítsünk táblázatot a mérési eredményeinkből a következőképpen:

kémcső	pH	A _p	maradék acetil -kolin (mg)
--------	----	----------------	----------------------------

Ábrázoljuk a maradék acetil-kolin mennyiségét a pH függvényében ! Értelmezzük a kapott görbét !

4. Az acetil-kolin észteráz gátlása:

Az acetil-kolin észteráz inhibitorok gyógyászati és toxikus tulajdonságai igen figyelemre méltóak.

A mezőgazdaságban inszekticidként széleskörűen alkalmazott szerves foszfátvegyületek mint pl. a paration vagy tabun bénítják az acetil-kolin észteráz működését azáltal, hogy az enzim aktív centrumában található Ser oldallánccal irreverzibilisen reagálnak. Antagonista hatásuk miatt az emberre is veszélyesek, a légzést bénítva halált okoznak. Így a vér kolin-észteráz aktivitásának mérése igen érzékeny indikátora lehet a mérgezéseknek.

Állítsuk össze a következő reakcióelegyeket:

Kémcsövek száma	Oldatok (ml)					A _v
	100% aktivitás					
	1	2	3	4	5	6
Szérum	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	-
Puffer pH=8.4	2,0	1,5	1,0	0,5	-	3,0
Inhibitor	-	0,5	1,0	1,5	2,0	1,0
Szubsztrát	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Inkubálás 37°C-on 30 percig, majd hozzáadjuk a reagenseket:						
Lúgos hidroxilamin	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
HCl:víz (1:1)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10%-os FeCl ₃	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Készítsük el a következő táblázatot:

Kémcső	A _p	A _v -A _p	acetil-kolin (mg)	aktivitás %	gátlás%
--------	----------------	--------------------------------	-------------------	-------------	---------

ÉDES MANDULÁBÓL SZÁRMAZÓ β -GLÜKOZIDÁZ ENZIMKINETIKAI VIZSGÁLATA

Az emulzin β -D-glükozidáz (β -D-glükozid glükohidroláz, EC 3.2.1.21) édes mandulában található meg, természetes szubsztrátja az amigdalinból keletkező cianogén β -monoglükozid, prunasin (benzaldehyd ciánhidrin β -D-glükozid), amelyet az enzim a glükozidos kötésnél hasít el. Az ílymódon szabaddá vált aglikon részből az β -hidroxinitril-liáz benzaldehydet és HCN-t szabadít fel. A folyamatban résztvevő enzimek és a szubsztrát az intakt növényi szövetekben külön kompartmentben helyezkedik el, így HCN felszabadulás csak a szövetek mechanikai sérülése - pl. a növény fogyasztása - következtében jelentkezik. A folyamatnak, és így a vizsgálat tárgyát képező enzimnek is a növényevők elleni védekezésben van jelentős szerepe.

Az emulzin β -glükozidáz széles szubsztrátspecifitást mutató enzim, azaz természetes cianogén szubsztrátja mellett hidrolizálja a szintetikus *p*-nitrofenil- β -D-glükopiranozidot, -galaktopiranozidot, fukopiranozidot is. Korábbi vizsgálatok szerint az enzim egyetlen katalitikus helyen hasítja el a különféle szubsztrátok glükozidos kötését, viszont két külön kötőhellyel rendelkezik a C-4 pozícióban eltérő konfigurációjú (glüko és galakto) szénhidrátrészek számára. A katalitikus nukleofil csoport egy glutamát-karboxilátnak bizonyult. A szubsztrátkötésben az ugyancsak a tanszéken végzett specifikus kémiai módosítások alapján három tirozil oldallánc vesz részt.

A β -glükozidázok általános hasítási mechanizmusában résztvevő két ionizálódó aminosav oldallánc közül az egyiknek deprotonálódnia kell, míg a másiknak protonált állapotban kell maradnia az enzim aktivitásához. Ezen oldalláncok savi disszociációs állandóját az enzim hatékonyságának (V_{\max}/K_M) pH-függése alapján, az oldalláncok típusát és számát pedig specifikus kémiai módosítások segítségével lehet meghatározni.

Az 1-tio glükózid típusú szubsztrátanalóg vegyületek (pl. PNP-S-Glc) a glükozidos O atom helyett S atomot tartalmaznak. Mivel a tioglükozidos kötés hasítása rendkívül lassan megy végbe, ezért ezek a molekulák inhibitorai az enzimnek, és szubsztrátanalógiájuknál fogva versengő (kompetitív) gátlást fejtenek ki.

A kereskedelmi forgalomban lévő emulzin β -glükozidáz készítmény három izoenzimből tevődik össze, melyek pI-juk alapján, kromatofókuszálással választhatók szét egymástól. Vizsgálatunk tárgyát most a pI 6.8 izoenzim képezi, melynek molekulatömege $M_r=135180+170$. Az enzim általában a klasszikus Michaelis-Menten kinetika szerint hasítja a különféle szubsztrátokat. A jelen gyakorlat keretében megismerkedünk az enzim kinetikai sajátágaival (V_{\max} , K_m) és működési mechanizmusával. Ennek során a "Grafit" enzimkinetikai programot fogjuk használni a kinetikai paraméterek meghatározásához.

I. A *p*-Nitrofenolát kalibrációs görbe felvétele

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
automata pipetták

Anyagok: "A" puffer: 0.15 M citromsav- Na_2HPO_4 , pH=5.2 puffer,
3 mM NaN_3 .
"B" puffer: 0.2 M bórsav- NaOH , pH=10.0 puffer.
p-Nitrofenol (PNP) 10^{-4} M

Feladat:

Készítsünk az "A" és "B" puffer 1:2 arányú elegyében 0.1 mM *p*-nitrofenolát törzsoldatot. Az oldat intenzív sárga színe a *p*-nitrofenolát anionra jellemző. Ezután mérjük össze a következő kalibrációs sorozatot:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
PNP oldat (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
A+B 1:2 pufferelegy (ml)	2.9	2.8	2.7	2.6	2.5	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0

Az oldatokat A:B, 1:2 arányú puffereleggyel szemben $\lambda=400$ nm-nél fotometráljuk, és az abszorbancia értékeket ábrázoljuk a PNP ionok nmol-ban (és nem nM-ban) kifejezett mennyiségének függvényében. A kinetikai mérések során ezt a kalibrációs görbét használjuk.

II. A K_m és V_{max} kinetikai paraméterek meghatározása *p*-Nitrofenil- β -D-glükopiranozid (PNP-Glc) szubsztráttal

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
stopper óra
automata pipetták
37 °C-os vízfürdő

Anyagok: "A" puffer
"B" puffer
emulzin β -glükozidáz-oldat (enzim-oldat)
5 mM PNP-Glc-oldat "A" pufferben elkészítve (szubsztrát)

Feladat:

0.5-3-0 K_M szubsztrátkoncentráció tartományban állítsuk össze a következő sorozatot:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Szubsztrát (ml)	0.05	0.075	0.1	0.125	0.15	0.2
"A" puffer	0.75	0.725	0.7	0.675	0.65	0.6

Az oldatokat helyezzük 37 °C-os vízfürdőbe, majd 5 perc előinkubálás után a reakciókat 200 µl-es enzimoldat-részletekkel egymást pl. 30 másodperces időtartamokkal követően indítjuk el. Az 5 perces reakcióidő letelte után a reakciókat 2 ml "B" puffer hozzáadásával állítjuk le (az elindításkor alkalmazott időtartamokkal egymást követően), és az oldatokat "A"+"B", 1:2 puffereleggyel szemben 400 nm-nél fotometráljuk. A kalibrációs görbe felhasználásával állapítsuk meg a felszabadult *p*-nitrofenolát mennyiségét, és számítsuk ki a reakciósebességeket nmol/perc egységekben. Ezután ábrázoljuk az $1/v=f(1/[S])$ egyenest, melynek tengelymetszeteiből kiszámíthatjuk a K_m és V_{max} paramétereket (Lineweaver-Burk linearizáció). A konstansok értékét nemlineáris illesztéssel is meghatározzuk (Grafit).

A reakcióelegyek fehérjetartalmát a fentebb megadott érték felhasználásával számítsuk ki, és a V_{max} paramétert adjuk meg a fajlagos enzimaktivitás SI-egységében, kat/kg-ban is. (1 kat/kg = 1 mol/sec elbomlott szubsztrát per 1 kg fehérje.)

III. Az enzimkoncentráció hatása a reakciósebességre

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
stopper óra
automata pipetták
37 °C-os vízfürdő

Anyagok: "A" puffer
"B" puffer
emulzin β-glükozidáz-oldat (enzim-oldat)
5 mM PNP-Glc-oldat "A" pufferben elkészítve (szubsztrát)

Feladat:

Állítsuk össze a következő oldatsorozatot:

	1.	2.	3.	4.	5.
Enzim (ml)0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	
"A" puffer (ml)	0.75	0.7	0.6	0.5	0.4

Majd öt perces előinkubálás után adjuk a reakcióelegyekhez a szubsztrátot:

Szubsztrát (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
-----------------	-----	-----	-----	-----	-----

Tehát 5 perces előinkubáció után a feltüntetett szubsztrát térfogatokkal indítsuk a reakciót. Az 5 perces reakcióidő letelte után a reakciókat 2 ml "B" puffer hozzáadásával állítjuk le (az elindításkor alkalmazott időtartamokkal egymást követően), és az oldatokat "A"+"B", 1:2 puffereleggyel szemben 400 nm-nél fotometráljuk. A kalibrációs görbe felhasználásával állapítsuk meg a felszabadult *p*-nitrofenolát mennyiségét, és számítsuk ki a reakciósebességeket nmol/perc egységekben. A kapott reakciósebességeket ábrázoljuk a fehérjetartalom vagy térfogat függvényében és magyarázzuk meg a tapasztalt enzimkoncentráció-függést.

IV. A tiofenil-β-D-glükopiranozid (TP-Glc) szubsztrátanalóg vagy glükonsav-δ-lakton átmenti állapot analóg inhibitor gátló hatásának vizsgálata

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
stopper óra
automata pipetták
37 °C-os vízfürdő

Anyagok: "A" puffer
"B" puffer
emulzin β-glükozidáz-oldat (enzim-oldat)
5 mM PNP-Glc-oldat "A" pufferben elkészítve (szubsztrát)
20 mM TP-Glc inhibitoroldat "A" pufferben elkészítve
glükonsav-δ-lakton oldat "A" pufferben elkészítve

Feladat:

Mérjük össze a következő két oldatsorozatot:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Inhibitor (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Szubsztrát (ml)	0.05	0.075	0.1	0.125	0.15	0.2
"A" puffer (ml)	0.7	0.675	0.65	0.625	0.6	0.55

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Inhibitor (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Szubsztrát (ml)	0.05	0.075	0.1	0.125	0.15	0.2
"A" puffer (ml)	0.65	0.625	0.6	0.575	0.55	0.5

A két oldatsorozatot helyezük 37 °C-os vízfürdőbe és 200 µl enzimoldatokkal a II. fejezetben leírt módon reakciósebesség-méréseket végezzünk. Ezután ábrázoljuk az $1/v=f(1/[S])$ (Lineweaver-Burk), valamint az $1/v=f([I])$ (Dixon) függvényeket. Állapítsuk meg

a gátlás típusát és becsüljük meg a gátlási állandó (K_I) értékét. Ezt a paramétert nem-lineáris illesztéssel is határozzuk meg.

V. Az enzim működésének hőmérsékleti optimuma, az aktiválási szabadentalpia (ΔG) meghatározása.

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
stopper óra
automata pipetták
változtatható hőmérsékletű (25-80 °C) vízfürdő

Anyagok: "A" puffer
"B" puffer
emulzin β -glükózidáz-oldat (enzim-oldat)
5 mM PNP-Glc-oldat "A" pufferben elkészítve (szubsztrát)

Feladat:

0.5 ml szubsztrátoldatot és 0.45 ml "A" puffert tartalmazó reakcióelegyek felhasználásával a II. fejezetben leírt módon határozzuk meg a reakciósebességeket a következő t hőmérsékleteknél:

25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C.

A reakciósebességek ismeretében ábrázoljuk a $v=f(t)$ függvényt és értelmezzük annak menetét.

A 25 °C - 50 °C hőmérséklet-tartományban az Arrhenius egyenletnek megfelelően ábrázoljuk az $\ln(v)=f(1/T)$ egyenest, ahol T az abszolút hőmérséklet Kelvinben, és az egyenes meredeksége egyenlő $\Delta G / R$ -rel. R az univerzális gázállandó, értéke $8.313 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$. A ΔG értékét hasonlítsuk össze a kémiai kötések kialakulásakor megfigyelhető szabadentalpia-változások nagyságával.

Megjegyzés:

Az Arrhenius egyenlet: $k=Ae^{-E/RT}$, ahol k a sebességi állandó, E az aktiválási energia. Az egyenlet linearizált formája: $\ln(k/A)=-E/RT$. Esetünkben: $k=v$, $E=\Delta G$.

VI. Az enzim működésének pH-optimuma, az enzim aktivitásában szerepet játszó katalitikus aminosav oldalláncok savi disszociációs állandójának meghatározása

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
stopper óra
automata pipetták

37 °C-os vízfürdő

Anyagok:

pH=3.0, 4.0, 4.5, 5.2, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0-es, 0.15 M citromsav-
Na₂HPO₄ pufferek.

"B" puffer

emulzin β-glükozidáz-oldat

5 mM PNP-Glc-oldat deszt. vízben készítve

Feladat:

Végezzünk reakciósebesség meghatározásokat a II. fejezetben leírtaknak megfelelően egy olyan mintasorozat felhasználásával, melyben a minták 0.7 ml szubsztrátot és 0.25 ml különböző pH-jú puffert tartalmaznak a pH 3.5-8.0 tartományban. Az 50 µl enzimoldattal nyert sebességeket ábrázoljuk a pH függvényében és értelmezzük a kapott görbét. A maximális sebesség feléhez tartozó pH-érték jó közelítéssel az enzim katalízisben résztvevő disszociálabilis csoportjainak *pK* értékével (*pK*= a savi disszociációs állandó negatív logaritmus) egyenlő. A savi disszociációs állandót nemlineáris illesztéssel, a Grafit^R enzimkinetikai program segítségével is meghatározzuk. A kapott *pK* értékek alapján próbáljuk megállapítani a katalitikus aminosavak típusát, ill. ezen csoportok katalízisben betöltött szerepét.

AZ *E. COLI* BAKTÉRIUM β -D-GALAKTOZIDÁZÁNAK ENZIMKINETIKAI VIZSGÁLATA

Az *E. coli* baktérium laktózt hasító β -galaktozidáz enzimének képződését, a laktóz permeáz és a tiogalaktozid transzacetiláz proteinekkal együtt a *lac* operon szabályozza. Ha a tápközegben laktóz nincs jelen, akkor a *lac* represszor fehérje az operon operátor régiójához kapcsolódva meggátolja a struktúrgének átírását, így a citoplazmában a β -D-galaktozidáz molekulák száma csupán 10 körüli. Ezzel szemben, amikor a baktériumot laktózt tartalmazó tápközegbe visszük át, a β -D-galaktozidáz molekulák száma ugrásszerűen többeszeresére nő. A β -D-galaktozidáz tehát indukálható protein. Fiziológiai körülmények között a természetes inducer az 1,6-allo-laktóz, ami éppen a β -D-galaktozidáz hatására képződik laktózból transzglikozilezéssel. Az enzim igen hatékony nem metabolizálódó inducere az izopropil-1-tio- β -D-galaktopiranozid (IPTG).

Az *E. coli* β -D-galaktozidáz enzimológiai és enzimkinetikai sajátosságai szintén jól ismertek. Az enzim 4 alegységből álló (alegység: 125 000 kDa) metallo-protein, melynek működéséhez alegységenként egy Mg^{2+} -ion kapcsolódása szükséges. Az enzim, összetett szerkezete ellenére, a különféle szubsztrátokat általában Michaelis-Menten kinetikának megfelelően hasítja. A jelen gyakorlat során megismerkedünk az enzim kinetikai sajátosságaival és működési mechanizmusával.

I. A *p*-Nitrofenolát kalibrációs görbe felvétele

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
automata pipetták

Anyagok: "A" puffer: 0.1 M NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH=7.3 puffer, ami 1 mM $MgCl_2$ -ot és 3 mM NaN_3 -ot is tartalmaz.
"B" puffer: 0.2 M bórsav- $NaOH$, pH=11.0 puffer, ami 10 mM EDTA-t is tartalmaz.
p-Nitrofenol (PNP)

Feladat:

Készítsünk az "A" és "B" puffer 1:2 arányú elegyében 1 mM *p*-nitrofenolát törzsoldatot. Az oldat intenzív sárga színe a *p*-nitrofenolát anionra jellemző. Ezután mérjük össze a következő kalibrációs sorozatot:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
PNP	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45
oldat (ml)									
A+B 1:2	2.95	2.9	2.85	2.8	2.75	2.7	2.65	2.6	2.55
pufferelegy (ml)									

Az oldatokat A:B, 1:2 arányú puffereleggyel szemben $\lambda=400$ nm-nél fotometráljuk, és az abszorbancia értékeket ábrázoljuk a PNP ionok nmol-ban (és nem nM-ban) kifejezett mennyiségének függvényében. A kinetikai mérések során ezt a kalibrációs görbét használjuk!

II. A K_m és V_{max} kinetikai paraméterek meghatározása *p*-Nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (PNP-Gal) szubsztráttal.

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
stopper óra
automata pipetták
37 °C-os vízfürdő

Anyagok: "A" puffer
"B" puffer
E. coli β -galaktozidáz-oldat (enzim-oldat)
1 mM PNP-Gal-oldat az "A" pufferben elkészítve (szubsztrát)

Feladat:

A Sigma Chemical Company (St. Louis. MO. USA) gyártott enzimpreparátum (kódszám G-6512, fehérjetartalom 23 mg/ml, biuret reagenssel meghatározva) 1 μ l-ét higítsuk meg 10 ml-re az "A" pufferrel (10000-szeres hígulás)! Az enzimkinetikai mérések során ezt az enzim törzsoldatot használjuk. A 0.5-5.0 K_m szubsztrátkoncentráció tartományban állítsuk össze a következő sorozatot:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Szubsztrát (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
"A" puffer	0.9	0.85	0.75	0.65	0.55	0.45	0.35

Az oldatokat helyezzük 37 °C-os vízfürdőbe, majd 5 perc előinkubálás után a reakciókat 50 μ l-es enzimoldat-részletekkel egymást pl. 30 másodperces időtartamokkal követően indítsuk el. Az 5 perces reakcióidő letelte után a reakciókat 2 ml "B" puffer hozzáadásával állítjuk le (az elindításkor alkalmazott időtartamokkal egymást követően), és az oldatokat "A"+"B", 1:2 puffereleggyel szemben 400 nm-nél fotometráljuk. A kalibrációs görbe felhasználásával állapítsuk meg a felszabadult *p*-nitrofenolát mennyiségét, és számítsuk ki a reakciósebességeket nmol/perc egységekben. Ezután ábrázoljuk az $1/v=f(1/[S])$ egyenest, melynek tengelymetszeteiből kiszámíthatjuk a K_M és V_{max} paramétereket (Lineweaver-Burk linearizáció). A konstansok értékét nemlineáris illesztéssel is meghatározzuk (Grafít).

A reakcióelegyek fehérjetartalmát a fentebb megadott érték felhasználásával számítsuk ki, és a V_{max} paramétert adjuk meg a fajlagos enzimaktivitás SI-egységében, kat/kg-ban is. (1 kat/kg = 1 mol/sec elbomlott szubsztrát per 1 kg fehérje.)

III. Az enzimkoncentráció hatása a reakciósebességre

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
stopper óra
automata pipetták
37 °C-os vízfürdő

Anyagok: "A" puffer
"B" puffer
E. coli β -galaktozidáz-oldat (enzim-oldat)
1 mM PNP-Gal-oldat az "A" pufferben elkészítve (szubsztrát)

Feladat:

Állítsuk össze a következő oldatsorozatot:

	1.	2.	3.	4.	5.
Szubsztrát (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
"A" puffer (ml)	0.46	0.44	0.42	0.4	0.38

Majd 5 perces előinkubálás után adjuk a reakcióelegyekhez az enzimet:

Enzim (ml)	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12
------------	------	------	------	-----	------

Tehát 5 perces előinkubáció után a feltüntetett enzim-térfogatokkal indítsuk a reakciót. Ezt követően járjunk el a II. fejezetben leírtak szerint. A kapott reakciósebességeket ábrázoljuk a fehérjetartalom (μg) függvényében és diszkutáljuk a tapasztalt enzimkoncentráció-függést.

IV. A tiofenil- β -D-galaktopiranozid (TP-Gal) szubsztrátanalóg inhibitor gátló hatásának vizsgálata.

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
stopper óra
automata pipetták
37 °C-os vízfürdő

Anyagok: "A" puffer
"B" puffer
E. coli β -galaktozidáz-oldat (enzim-oldat)
1 mM PNP-Gal-oldat az "A" pufferben elkészítve (szubsztrát)
5 mM TP-Gal inhibitoroldat "A" pufferben elkészítve

Feladat:

Mérjük össze a következő három oldatsorozatot:

	1.	2.	3.	4.
Inhibitor (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2
Szubsztrát (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3
"A" puffer (ml)	0.7	0.65	0.55	0.45

	1.	2.	3.	4.
Inhibitor (ml)	0.4	0.4	0.4	0.4
Szubsztrát (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3
"A" puffer (ml)	0.5	0.45	0.35	0.25

	1.	2.	3.	4.
Inhibitor (ml)	0.6	0.6	0.6	0.6
Szubsztrát (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3
"A" puffer (ml)	0.3	0.25	0.15	0.05

A három oldatsorozatot helyezzük 37 °C-os vízfürdőbe, és 50 µl enzimoldatokkal a II. fejezetben leírt módon reakciósebesség-méréseket. Ezután ábrázoljuk az $1/v=f(1/[S])$ (Lineweaver-Burk), valamint az $1/v = f([I])$ (Dixon) függvényeket. Állapítsuk meg a gátlás típusát és becsüljük meg a gátlási állandó (K_I) értékét. Ezt a paramétert nem-lineáris illesztéssel is határozzuk meg.

V. Az enzim működésének hőmérsékleti optimuma, az aktiválási szabadentalpia (ΔG) meghatározása.

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
stopper óra
automata pipetták
változtatható hőmérsékletű (25-80 °C) vízfürdő

Anyagok: "A" puffer
"B" puffer
E. coli β -galaktozidáz-oldat (enzim-oldat)
1 mM PNP-Gal-oldat az "A" pufferben elkészítve (szubsztrát)

Feladat:

0.5 ml szubsztrátoldatot és 0.45 ml "A" puffert tartalmazó reakcióelegyek felhasználásával a II. fejezetben leírt módon határozzuk meg a reakciósebességeket a következő t hőmérsékleteknél:

25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C.

A reakciósebességek ismeretében ábrázoljuk a $v=f(t)$ függvényt és értelmezzük annak menetét.

A 25 °C - 50 °C hőmérséklet-tartományban az Arrhenius egyenletnek megfelelően ábrázoljuk az $\ln(v)=f(1/T)$ egyenest, ahol T az abszolút hőmérséklet Kelvinben, és az egyenes meredeksége egyenlő $\Delta G / R$ -rel. R az univerzális gázállandó, értéke

8.313 Jmol⁻¹K⁻¹. A ΔG értékét hasonlítsuk össze a kémiai kötések kialakulásakor megfigyelhető szabadentalpia-változások nagyságával.

Megjegyzés: Az Arrhenius egyenlet: $k=Ae^{-E/RT}$, ahol k a sebességi állandó, E az aktiválási energia. Az egyenlet linearizált formája: $\ln(k/A) = -E/RT$. Esetünkben: $k=v$, $E=\Delta G$.

VI. Az enzim működésének pH-optimuma, az enzim aktivitásában szerepet játszó katalitikus aminosav oldalláncok savi disszociációs állandójának meghatározása

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
stopper óra
automata pipetták
37 °C-os vízfürdő

Anyagok: pH=5.8, 6.3, 6.8, 7.3 és 7.8-as 0.1 M NaH₂PO₄-Na₂HPO₄,
pufferek, amelyek 1 mM MgCl₂-ot és 3 mM NaN₃-ot is tartalmaznak.
pH=8.3, 8.8, 9.3 és 9.8-as 0.1 M Tris-HCl pufferek, amelyek 1 mM MgCl₂-ot is tartalmaznak.
"B" puffer
E. coli β -galaktozidáz-oldat (enzim-oldat)
1 mM PNP-Gal-oldat az "A" pufferben elkészítve (szubsztrát)

Feladat:

Végezzünk reakciósebesség meghatározásokat a II. fejezetben leírtaknak megfelelően egy olyan mintasorozat felhasználásával, melyben a minták 0.5 ml szubsztrátot és 0.45 ml különböző pH-jú puffert tartalmaznak a pH 5.8-9.8 tartományban. Az 50 μ l enzimoldattal nyert sebességeket ábrázoljuk a pH függvényében és értelmezzük a kapott görbét. A maximális sebesség feléhez tartozó pH-érték jó közelítéssel az enzim katalízisben résztvevő disszociálabilis csoportjainak pK értékével (pK = a savi disszociációs állandó negatív logaritmus) egyenlő. A savi disszociációs állandót nemlineáris illesztéssel, a Grafit enzimkinetikai program segítségével is meghatározzuk. A kapott pK értékek alapján próbáljuk megállapítani a katalitikus aminosavak típusát, ill. ezen csoportok katalízisben betöltött szerepét.

PLAZMID DNS GYORS IZOLÁLÁSA (GYORS TESZT)

A DNS in vitro manipulálásának első lépését a vektor DNS és a klónozendó DNS izolálása jelenti. A DNS tisztításának alapvető lépései a következők: (1) az oldható, nagy molekulatömegű DNS kiszabadítása a szétroncsolt sejttel és sejtmembrántörmelékből; (2) a DNS-protein komplexek (polimeráz, ligáz, rekombinááz, endonukleáz, repair enzimek, vírusgenom esetén burokkészítmények stb.) felbontása denaturálással vagy proteázos emésztéssel; (3) a DNS szeparálása más makromolekuláktól.

A baktériumok genomiális DNS-ének tisztítása a sejttel gyengítésével kezdődik (fagyasztás-felolvasztás vagy lizozimes kezelés). A sejtek szétroncsolása (lízis) detergenssek (Na-dodecil-szulfát, SDS) segítségével történik. Ezt követően a lizált sejtek oldatát pankréász ribonukleázzal és proteázzal kezelve szabadulnak meg az RNS-től és a fehérjétől. A visszamaradó fehérjék és oligonukleotidok szerves oldószerekkel (fenol) történő extrakcióval távolíthatók el. A viszkózus vizes fázisban maradó genomiális DNS-t alkohollal kicsapva, majd végül a kívánt pufferrel szemben dializálva lehet megszabadulni a fehérje, oligonukleotid, detergens és szerves oldószer szennyezéstől. Esetenként további CsCl₂ gradiens centrifugálással történő tisztításra is szükség van. Átlagosan 1 liter baktérium kultúrából 2-5 mg 50 x 10⁶ átlagos móltömegű DNS tisztítható ilyen módon.

Az extrakromoszómális DNS elemek (plazmidok és bakteriofágok) tisztítása során a preparátumot szennyező kromoszómális DNS mennyiségének csökkentése a cél. Az izolálási módszerek háttérében az a tapasztalat áll, hogy az alkalikus pH-n denaturált (egyszálú) plazmid DNS kovalensen zárt cirkuláris, azaz "szupercoiled" (szuperfelcsavarodott) volta miatt nagyobb sebességgel renaturálódik (képez kettős hélixet) neutrális pH-ra állítva, mint a kromoszómális DNS. Egy másik ilyen különbség, hogy a szuperfelcsavarodott DNS (plazmid) több festéket (pl. etidium-bromid, interkaláló ágens) képes megkötni, mint a relaxált lineáris DNS, és így a festékkomplex sűrűsége is nagyobb lesz, ami lehetővé teszi egyensúlyi sűrűséggradiens centrifugálással vagy ligandként kötött festéket (akridin-narancs vagy fenol-vörös) tartalmazó affingélen történő szétválasztásukat. A kis molekulatömegű szennyező anyagok (oligonukleotidok és oligopeptidek) eltávolítására Sephadex G-50 vagy BioGel A50m mátrixon történő gélszűréssel nyílik lehetőség.

Olyan esetekben, ha az izolált plazmid DNS-t azért izoláljuk, hogy (1) bizonyítsuk a plazmid jelenlétét a gazdasejtekben, vagy (2) a plazmid közelítő nagyságát kívánjuk megállapítani, vagy pedig (3) limitált restrikciós hasítóhely analízis végrehajtása a cél, nincs szükség mg mennyiségű plazmid DNS izolálására. Számos módszert írtak le részlegesen tiszta plazmid DNS gyors kinyerésére (gyorsteszt DNS), melyek lényege a szuperfelcsavarodott DNS reverzibilis denaturációján és az SDS szelektív kicsapásán alapul. Ennek a gyorsstesztnek abban az esetben van jelentősége, amikor nagy számú transzformáns baktériumkolóniát kell megvizsgálni a rekombináns DNS jelenléte szempontjából.

Kromoszómális DNS kinyerése eukarióta sejtekből eltérő technikát igényel a sejtmag és a sejtorganellumok jelenléte miatt. Amennyiben a magi vagy az organelláris (kloroplaszt vagy mitochondrium) DNS szelektív izolálása a cél, a sejteket egy enyhe lízisnek vetik alá, melynek során ezek az organellumok nem sérülnek, és buoyant sűrűségük és detergens érzékenyséjük eltérő volta miatt homogenitásig tisztíthatók. A DNS ezt követően lízissel szabadítható ki és a fentebbiekhez hasonló módon tisztítható.

A tisztított DNS koncentrációjának és tisztasági fokának meghatározása spektrofotometriásan történik 260 nm-es hullámhosszon ahol a dupla helikális DNS maximális elnyelést mutat. Az A₂₆₀=0.1 abszorbanciaérték 5 µg/ml DNS koncentrációnak felel meg. Ugyanakkor ezen a hullámhosszon elnyelést mutatnak az RNS, a szerves oldószerek,

detergensek és a fehérjék is. A DNS preparátum tisztaságának jellemzésére az A_{260}/A_{280} arány használható, amely tiszta *E. coli* DNS esetében 1.95.

Anyagok:

SET puffer: 20% szacharóz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.6.
Lízis keverék: 1% SDS, 0.2 M NaOH (készítsünk frisset kéthetenként).
3.0 M Na-acetát puffer, pH 4.8.
RNáz puffer: Pankreász ribonukleáz A, 10 mg/ml: 0.1 M Na-acetát, 0.3 mM EDTA, pH 4.8 oldatban készítve, amelyet előzőleg 10 percig 80 °C-on melegítettünk.
Izopropanol.
Etanol: 70%.
Víz (bdH₂O): steril, bidesztillált.
Luria médium (LB): 3 ml.
Jég.

Feladat:

Első nap

1. Növesszünk pBR329, pPV33 és pPV501 plazmidot hordozó RR1 sejtekből három 1.5 ml-es LB kultúrát a sejtnövekedés stacionárius fázisáig.
2. Öntsük a kultúrákat külön mikrocentrifuga csövekbe és centrifugáljuk 0.5 percig. (A centrifugálási lépéseket mindig 1.5 ml-es csövekben kell végrehajtani.)
3. A sejteket alaposan szuszpendáljuk fel 1-1 ml SET pufferben 1 perces kevertetéssel kémcsőkeverő felhasználásával.
4. Centrifugáljuk le a sejteket 1 perc alatt, majd szuszpendáljuk fel 150-150 µl SET pufferben.
5. Adjunk a csövekhez 5-5 µl RNáz puffert és kevertessük meg őket. Adjunk 350-350 µl lízis keveréket szobahőmérsékleten. Kevertessük 1 másodpercig. Az oldatok ekkor kitisztulnak.
6. Tegyük a csöveket jégre és 10 percig inkubáljuk őket.
7. Mérjünk 250-250 µl Na-acetát puffert a centrifugacsövekbe és azokat többször megfordítva keverjük össze a már benne lévő eleggyel. Inkubáljuk a csöveket 30 percig jégen. Ennek hatására a SDS és a denaturált kromoszómális DNS kicsapódik az oldatból.
8. Centrifugáljuk az oldatokat 5 percig 4 °C-on. A felülúszókat (kb. 700 µl) pipetázzuk tiszta centrifugacsövekbe.
9. Mérjünk a csövekbe a felülúszó térfogatának megfelelő mennyiségű izopropanolt. A csöveket többször fordítsuk meg és vissza, majd szobahőmérsékleten centrifugáljuk őket újabb 5 percen át. A csöveket megfordítva öntsük ki az izopropanolt.
10. Mossuk a DNS-t 1 ml 70%-os etanollal. Centrifugáljuk az oldatokat 5 percig szobahőmérsékleten. Öntsük le az etanolt és szárítsuk a csöveket vákuum alatt 10 percen keresztül.
11. A restrikciós emésztésekhez 1-2 µl így elkészített gyors teszt DNS-t használjunk.

Megjegyzés: Ha a restrikciós emésztés nem megy végbe teljesen, akkor iktassunk be egy második 70%-os etanolos mosási lépést is.

Ezt a módszert használhatjuk M13 RF DNS izolálása esetén is

PLAZMID ÉS E. COLI KROMOSZÓMÁLIS DNS HASÍTÁSA RESTRIKCIÓS ENDONUKLEÁZZAL

A restrikciós endonukleázok felfedezése tette lehetővé a rekombináns DNS technológia kifejlődését. Ezek az enzimek képesek a DNS szekvenciaspecifikus hasítására, s így magára az enzimre és a DNS-re jellemző hasítási mintázat létrehozására, azaz a kettős szálú DNS úgynevezett restrikciós (korlátozott) fragmentumokra történő bontására. Előfordulásuk a mikroorganizmusok körében általánosnak mondható.

A baktériumok restrikciós-modifikációs rendszerének felfedezéséhez az úgynevezett gazdaspecifitás jelenségének felismerése vezetett: azaz egy adott *E. coli* törzsben felszaporított lambda bakteriofág fertőzőképessége nagyobb ugyanarra a törzsről nézve, mint egy másikra. Ez a rendszer az *E. coli*-ban három kapcsolt gén működését tételezi föl. A *hsdM* génterméke specifikus helyeken metilálja a DNS-t, hogy ezzel megvédje a *hsdR* által kódolt endonukleáz hatásától. A *hsdS* termékére a másik két enzim specifikálásának meghatározásában van szükség. Ez a rendszer a sejtbe fertőzés, konjugáció vagy transzformáció útján bejutott DNS lebontását végzi, ha az nem rendelkezik a megfelelő metiláltsági mintázattal. A restrikciós enzimek fiziológiai funkciója pontosan még nem tisztázott, és a fertőzések elleni védekezés mellett az úgynevezett "helyspecifikus illegitim rekombináció"-ban játszhat még szerepet, amely lehetővé teszi a genetikailag nem rokon organizmusok közötti géncserét is.

A restrikciós-modifikációs rendszer endonukleázait, amelyek, multimer enzimek lévén, képesek mind metilezési, mind pedig hasítási műveletek végrehajtására, I. típusúaknak nevezzük. A restrikciós endonukleázok egy másik csoportjának (II. típus) tagjai monomer-monofunkciós enzimeket tartalmaznak. Mivel ez utóbbiak között vannak olyanok, amelyek ragadós (kohézív) hasítási végeket képesek létrehozni a kétszálú DNS-en, ezek váltak a DNS analízis és újrastrukturálás elsődleges eszközeivé. Az eddig felfedezett mintegy 250 restrikciós enzim elnevezési rendszerének elve a következő: az első három betű a forrás organizmus nevét takarja, és ezt követheti egy újabb, a törzset azonosító betű. Majd az ezután álló római szám az enzimnek az adott organizmusban való felfedezési sorrendjére utal. Példaképpen: a *HinfI* a *Haemophilus influenzae* baktérium f törzsében elsőként felfedezett restrikciós endonukleáz jelöli.

A különböző restrikciós endonukleázok specificitása és hasítási módja jellemző az enzimekre, néha tökéletes egyezést is mutathat (perfekt isoschizomereknek). Előfordul az is, hogy a hasítási hely specificitás azonos, a hasítás módja viszont eltérő (imperpekt isoschizomerek). A II. típusú restrikciós endonukleázok felismerési helye a DNS-en általában 4 (tetramer), 5 (pentamer) vagy 6 (hexamer) nukleotid hosszúságú, és legtöbbször palindróm (kétoldali forgásszimmetrikus) szekvenciát mutat. Ez annyit jelent, hogy a DNS egyik szálának szekvenciája megegyezik a komplementer száléval, amennyiben azt 5'-3' irányban olvassuk.

A felismerőhely hosszúsága hatással van annak egy adott DNS-ben való előfordulási gyakoriságára, ami hozzávetőleg $(1/4)^N$, ahol N a restrikciós szekvencia hossza. A hasítóhelyek várható számát az adott DNS hosszának és a hasítóhelyek gyakoriságának szorzata becsli. (Az *EcoRI* enzim hasítóhelyeinek száma 5000 bp-onként egy.)

Tetranukleotid		Pentanukleotid		Hexanukleotid	
<i>AluI</i>	AG↓CT	<i>EcoRII</i>	↓CCAGG	<i>AvaI</i>	C↓PyCGPuG
<i>HaeIII</i>	GG↓CC	<i>HinfI</i>	G↓ANTC	<i>BamHI</i>	G↓CATCC

<i>HhaI</i>	GCG↓C			<i>BglII</i>	A↓GATCT
<i>HpaII</i>	C↓CGG			<i>BalI</i>	TGG↓CCA
<i>MboI</i>	↓GATC			<i>EcoRI</i>	G↓AATCC
<i>TaqI</i>	T↓CGA	<i>HphI</i>	GGTGA(N) ₈ ↓	<i>HindIII</i>	A↓AGCTT
		<i>MboII</i>	GAAGA(N) ₈ ↓	<i>HpaI</i>	GTT↓AAC
				<i>PstI</i>	CTGCA↓G
				<i>XmaI</i>	C↓CCGGG
<i>DpnI</i>	GA↓TC			<i>SmaI</i>	CCC↓GGG
	amikor módosított			<i>HaeII</i>	PuGCGC↓Py
				<i>HincII</i>	GTPy↓PuAC

A kettős szálú DNS-en a restrikciós enzimek általában a hasítóhely háromféle pozíciójában vághatnak: (1) középpontban és tompa véget létrehozva (*HaeIII*), (2) középtől balra és ragadós végeket kialakítva 5' foszfát csoporttal (*EcoRI*) vagy (3) középponttól jobbra és ragadós végeket képezve 3' foszfát csoporttal. Egyesek teljesen szokatlan módon hasítják a DNS-t, pl. az *MboI*:



Mindamellett a hasítás során fennálló körülmények (pH, ionerősség, glicerol) befolyásolhatják az enzimek specificitását, ezért a restrikciós emésztések során mindig az adott enzimnek megfelelő körülményeket kell alkalmazni. A DNS emésztését követően gyakran szükséges az endonukleáz inaktiválása, ami 65 °C-on történő 5 perces inkubálással, vagy hőrezisztens enzimek (*BamHI*, *HaeIII*) esetén más módszerrel vitelezhető ki. Az úgynevezett "leállító keverék" (Stop Mix), amelyet a DNS mintához a gélelektroforézist megelőzően adunk, fehérje denaturáló ágenst (SDS vagy urea) tartalmaz, ami ugyancsak inaktiválja az enzimet. Alternatív lehetőség a DNS fenol-kloroformos extrakció útján való elkülönítése a fehérjétől (lásd előző gyakorlat).

Annak ellenére, hogy ma már mintegy 40 restrikciós enzim férhető hozzá a piacról sokszor felmerül a hasítóhelyek egymásba történő átalakításának igénye, azaz, hogy például egy tompa végekre hasadó restrikciós szekvenciát egy ragadós végekre hasadó szekvenciává változtassunk. Ezeket a manipulációkat (1) szintetikus oligonukleotid típusú restrikciós hely kapcsolók (restriction site linker) vagy (2) DNS-módosító enzimek (DNS-polimeráz Klenow-fragment, T4 DNS-polimeráz) segítségével lehet kivitelezni.

A jelen gyakorlat során megismerkedünk a gyorsteszt és a tisztított plazmid és kromoszómális DNS restrikciós emésztésének körülményeivel és a hasítási mintázat gél elektroforézissel történő elemzési módszerével.

Anyagok:

PstI reakció puffer (10X): 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 500 mM (NH₄)₂SO₄.

HindIII reakció puffer (10X): 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 70 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 70 mM 2-merkaptoetanol.

PstI endonukleáz: 1 egység/μl hígításban.

HindIII endonukleáz: 1 egység/μl hígításban.

Hígító puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM Na₂EDTA, 1 mM ditiotritol (Cleland reagents), 50 % glicerol, 500 μg/ml BSA.

Reakciót leállító puffer: 5 M urea, 10 % glicerol, 0.5 % SDS, 0.025 %

xylol cianol FF, 0.025 % brómfenolkék WS.
Gyors teszt plazmid DNS
Tisztított plazmid DNS
E. coli kromoszómális DNS
Lambda bakteriofág DNS
Víz (bdH₂O): Steril bidesztillált.

Megjegyzés:

A restrikciós endonukleázokat a kísérlet megkezdését közvetlenül megelőzően kell a megfelelő koncentrációjúra hígítani. A legtöbb kereskedelmi restrikciós endonukleáz esetében az egységnyi aktivitásnak az az enzimmennyiség felel meg, amely 1 µg pBR329 vagy λ DNS-t 1 óra alatt hasít el a megfelelő reakcióköörülmények között. A DNS hasításának aktuális sebességét befolyásolhatja a DNS minta tisztasága és a DNS-en található hasítóhelyek számának aránya a standard DNS-en találhatóéhoz. A jelen gyakorlatban így esetleg több vagy kevesebb mint 1 egység enzimre van szükség a teljes emésztés eléréséhez. A gyakorlat során plazmid és bakteriális DNS preparálása folyik elektroforetikus analízis és ligálás céljára. A folyamat során az emésztett és emésztetlen plazmid és a kromoszómális DNS (gyors teszt és tisztított) mintázata kerül összehasonlításra. A gyakorlathoz tartozik még a molekulatömeg markerek elkészítése, amelyekre a restrikciós mintázat elektroforetikus jellemzésében a DNS fragmentek méretének meghatározásához van szükség.

Elővigyázatossági pontok

1. Az enzimreakciók élesben történő összeállítását megelőzően gyakoroljuk a mikropipetta* használatát víz vagy puffer mikrocentrifuga csövekbe történő bemérésével.
2. Minden egyes átvitelhez tiszta pipettahegyet (vagy mikropipillárist) kell használni. Ezzel a reaktánsok egymással történő elszennyezését (pl. DNS-t az enzimmel, az enzimet a pufferrel vagy bdH₂O-val). Ha a pipettahegy a reaktánsokon vagy a tiszta üvegedényeken kívül bármi máshoz hozzáér, új hegyre kell cserélni azt.

Feladat:

Első nap

1. Mikropipetta segítségével állítsuk össze a restrikciós endonukleázos emésztési reakcióelegyet 1.5 ml-es mikrocentrifugacsőben az alábbiak szerint. A reaktánsokat és a reakciócsöveket tartsuk mindig jégen, a reaktánsok bemérését pedig a bdH₂O-tól kezdjük és a DNS-sel fejezzük be.

* Mikropipettázó berendezés: a kutatómunkában két leggyakrabban használt mikropipetta típus a Gilson Model P-20D (0 µl-20 µl) és a P-200D (0 µl-200 µl) Pipetman (West Coast Scientific, Inc.).

1. Reakció

	<u>μl</u>
pBR329 gyors teszt DNS	2
1 egység <i>Pst</i> I endo.	1
10X <i>Pst</i> I puffer	1.5
bdH ₂ O	<u>10.5</u>
	15

2. Reakció

	<u>μl</u>
pPV33 gyors teszt DNS	1
1 egység <i>Pst</i> I endo.	1
10X <i>Pst</i> I puffer	1.5
bdH ₂ O	<u>10.5</u>
	15

3. Reakció

	<u>μl</u>
pPV501 gyors teszt DNS	1
1 egység <i>Pst</i> I endo.	1
10X <i>Pst</i> I puffer	1.5
bdH ₂ O	<u>10.5</u>
	15

- Miután a pBR329 gyors teszt DNS-t hozzáadtuk az 1. reakcióhoz, kevertessük 2 másodpercig kémcsőkeverő segítségével, majd rögtön ezután mérjünk 7 μl-t egy 3 μl reakcióleállító keveréket tartalmazó mikrocentrifuga csőbe. Ez a minta lesz az emésztetlen kontrol gyors teszt DNS.
- Helyezzük az 1., 2. és a 3. reakciót a jégről 37 °C-ra és inkubáljuk 30 percig. Állítsuk le a reakciókat reakcióleállító keverék hozzáadásával: adjunk 3 μl-t az 1-höz illetve 5-5 μl-t a 2. és 3-hoz.
- A fentieknek megfelelően állítsuk össze a következő emésztési reakciókat a tisztított pBR329, pPV33 és a pPV501 plazmid DNS felhasználásával.

4. Reakció

	<u>μl</u>
3 ?g tisztított pBR329 DNS	6
3 egység <i>Pst</i> I endo.	3
10X <i>Pst</i> I puffer	2
bdH ₂ O	<u>9</u>
	10

5. Reakció

	<u>μl</u>
0.5 ?g tisztított pPV33 DNS	1
1 egység <i>Pst</i> I endo.	1
10X <i>Pst</i> I puffer	1.5
bdH ₂ O	<u>7</u>
	10

6. Reakció	μl	7. Reakció	μl
0.5 μg tisztított pPV501 DNS	1	3 μg tisztított pBR329 DNS	6
1 egység <i>Pst</i> I endo.	1	3 egység <i>Hind</i> III endo.	3
10X <i>Pst</i> I puffer	1.5	10X <i>Hind</i> III puffer	2
bdH ₂ O	7	bdH ₂ O	9
	20		20

Megjegyzés:

A reakciókhoz adott DNS-oldatok térfogata egy feltételezett 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNS koncentráción alapul. A plazmid DNS-t ennek megfelelően kell meghigítani vagy bekonzentrálni. Általános szabály, hogy a hozzáadott DNS térfogata ne haladja meg a teljes reakciótérfogat 50 %-át.

- Miután a tisztított pBR329 DNS-t hozzáadtuk a 4. és a 7. reakcióhoz, kevertessük 2 másodpercig kémcsőkeverő segítségével, majd rögtön ezután a 4. reakcióból mérjünk 1 μl -t egy 9 μl reakcióleállító keveréket tartalmazó mikrocentrifuga csőbe. Ez a minta lesz az emésztetlen kontrol a 4. reakcióhoz.
- Helyezzük a 4. és a 7. reakciót a jégről 37 °C-ra és inkubáljuk 1 órán át. A reakciókat helyezzük mélyhűtőbe (-20 °C), amivel leállítjuk a restrikciós emésztést. Mielőtt -20 °C-ra tennénk a reakciókat, vegyünk 1-1 μl -t két mikrocentrifuga csőbe, melyekbe előzőleg 9-9 μl reakcióleállító keveréket mértünk be. Ezeket a mintákat használjuk majd az emésztés mértékének gél elektroforézissel történő meghatározásához.
- Az 5. és a 6. reakciót inkubáljuk 37 °C-on 30 percig. Állítsuk le a két reakciót 10 μl reakcióleállító keverék hozzáadásával.
- A reakcióleállító keveréket tartalmazó mintákat 4 °C-on tároljuk az elektroforetikus vizsgálat végrehajtásáig.

Második nap

- Állítsuk össze a következő restrikciós enzimes emésztéseket *E. coli* (AB257) kromoszómális DNS és nagy molekulatömegű λ DNS felhasználásával.

8. Reakció	μl	9. Reakció	μl
4 μg <i>E. coli</i> DNS	8	4 μg <i>E. coli</i> DNS	8
4 egység <i>Hind</i> III endo.	4	1 egység <i>Pst</i> I endo.	4
10X <i>Hind</i> III puffer	2	10X <i>Pst</i> I puffer	2
bdH ₂ O	6	bdH ₂ O	6
	20		20

10. Reakció

	μl
10 μg <i>E. coli</i> DNS	20
4 egység <i>Hind</i> III endo.	5
10X <i>Hind</i> III puffer	5
bdH ₂ O	<u>20</u>
	50

Megjegyzés:

A reakciókhoz adott DNS-oldatok térfogata egy feltételezett 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNS koncentráción alapul. Az *E. coli* és a λ DNS-t ennek megfelelően kell meghigítani vagy bekonzentrálni. Az enzimreakciók összefoglalását az I. táblázat adja meg.

I. TÁBLÁZAT

Első nap

Reakciók	1	2	3	4	5	6	7
DNS	pBR329 ^a	pPV33 ^a	pPV501 ^a	pBR329 ^b	pPV33 ^b	pPV501 ^b	pBR329 ^b
Enzim	<i>Pst</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III
Reakció térfogat	15	15	15	20	10	10	20
Inkubációs idő 30 perc	30 perc	30 perc	1 óra	30 perc	30 perc	1 óra	
Leállítás	3 μl RLK ^c	5 μl RLK ^c	5 μl RLK ^c	-20°C	10 μl RLK ^c	10 μl RLK ^c	10 μl RLK ^c
Végső térfogat	11 μl	20 μl	20 μl	18 μl	20 μl	20 μl	19 μl
Kontrol minta	7 μl	-	-	1 μl	-	-	-
Ellenőrző minta	-	-	-	1 μl	-	-	1 μl

Második nap

Reakciók	8	9	10
DNS	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	λ
Enzim	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III
Reakció térfogat	20	20	50
Inkubációs idő 1 óra	1 óra	2 óra	
Leállítás	-20°C	-20°C	-20°C
Végső térfogat	18 μl	18 μl	49 μl
Kontrol minta	1 μl	1 μl	-
Ellenőrző minta	1 μl	1 μl	1 μl

2. Miután az *E. coli* és a λ DNS-t hozzáadtuk a többi komponenshez, keverjük meg az összes csövet kémcsőkeverő segítségével 2 másodpercig, majd ezt követően a 8. és a 9. reakcióból mérjük 1-1 μ l-t két 9-9 μ l reakcióleállító keveréket tartalmazó mikrocentrifuga csőbe. Ez a minta képezi majd az emésztetlen kromoszómális DNS kontrollt.
3. Helyezzük a három reakciócsövet a jégről 37 °C-ra és inkubáljuk a 8. és 9. reakciót 1 órán át, a 10. reakciót pedig 2 órán keresztül. A reakciókat helyezzük mélyhűtőbe (-20 °C), amivel leállítjuk a restrikciós emésztést. Lefagyasztás előtt még vegyünk 1-1 μ l mintát a reakciókból és tegyük 9-9 μ l reakcióleállító keveréket tartalmazó mikrocentrifuga csővekbe. Ezeket a mintákat használjuk majd az emésztés mértékének követéséhez.

REAGENSEK KÉSZÍTÉSÉNEK RECEPTJEI

Reagensek a "Szénhidrátok vizsgálata" című gyakorlathoz

1. Anthron reagens:

500 mg etanolból átkristályosított tiszta anthront és 10 g alt. tiokarbamidot oldunk 1000 ml 72%-os kénsavban, rázogatás közben 80-90°C-on. (72%-os kénsav készítése: 280 ml desztillált vízhez lassan kevergetés közben 220 ml 1,84 fs-ú kénsavat adunk). Az anyagok feloldása után az oldatot lehűtjük. 2 hétig jégszekrényben tárolhatjuk.

2. Barfoed reagens:

24 g rézacetátot 450 ml forró desztillált vízben oldunk. (Ha csapadék képződik, nem kell szűrni.) Majd rögtön 25 ml 8,5%-os tejsavoldatot adunk a forró oldathoz. Rázás közben a csapadék feloldódik. Hűtés után 500 ml-re töltjük fel.

3. Benedict reagens:

a.) 173 g nátrium-citrátot és 100 g vízmentes nátrium-karbonátot oldjunk kb. 800 ml vízben melegítéssel. Szűrjük az oldatot.

b.) 17,3 g rézsulfátot oldjunk 100 ml vízben.

A b. oldatot öntsük keveréssel az a. oldathoz és azután egészítsük ki az oldatot 1000 ml-re.

4. Bial reagens:

a.) 0,025 g vaskloridot 2,5 ml desztillált vízben feloldjuk.

b.) 3 g orcint 1000 ml cc. sósavban feloldunk. Oldódás után az a. és b. oldatokat összeöntjük.

5. Fehling I:

34,69 g rézsulfátot vízben oldunk és az oldatot 500 ml-re öntjük fel.

6. Fehling II:

125 g NaOH-t és 173 g KNa-tartarátot oldunk vízben és 500 ml-re töltjük fel.

7. Seliwanoff reagens:

0,05 g rezorcinolt oldunk 100 ml 25%-os sósavban.

8. Somogyi A oldat:

25 g vízmentes Na_2CO_3 -ot, 25 g KNa-tartarátot, 20 g NaHCO_3 -ot és 200 g vízmentes Na_2SO_4 -ot vízben oldunk és 1000 ml-re egészítjük ki.

Az oldat ne hűljön soha 20°C alá.

9. Somogyi B oldat:

15%-os $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ amely 100 ml-ként 1-2 csepp cc. H_2SO_4 -t tartalmaz.

10. Nelson C oldat:

a.) 25 g $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ -t oldunk 450 ml vízben és 21 ml cc. H_2SO_4 -t adunk hozzá állandó keverés közben.

b.) 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -t oldunk 25 ml vízben.
Oldódás után az a. és b. oldatokat összeöntjük és hűtőben tároljuk.

11. Káliumjodidos-jód -oldat:

12,5 g KI-ot oldunk 12,5 ml desztillált vízben, hozzáadunk 0,038 I_2 -ot majd 1,5 ml cc.HCl-t. Az elegyet 500 ml-re egészítjük ki desztillált vízzel.

12. Dializált Fe oldat:

600 ml 60 %-os FeCl_3 -ot hígítsunk 4 l vízzel. Adjunk az oldathoz 10 %-os NH_4OH oldatot állandó keverés mellett míg az ammónia szaga érezhetővé válik. Szűrjük és mossuk a csapadékot vízzel, aztán oldjuk 100 cm^3 60 %-os FeCl_3 oldatban keveréssel és enyhe melegítéssel. Helyezzük az oldatot dializáló zsákba és dializáljuk állandóan kevert vízben egy éjszakán át. 2.8 dm^3 -re egészítsük ki az oldatot. Stabil, több évig eláll. A dializált vas oldat kiválóan alkalmas a tejfehérjének kicsapására, mivel nagy, pehelyszerű csapadékot ad, ami jól szűrhető vagy centrifugálható.

13. Difenilamin-anilin reagens:

4 g difenilamint 200 ml-es mérőlombikban feloldunk 100 ml acetonban. Hűtés közben hozzá adunk 4 ml anilint. Ha az oldat kitisztult hozzá adunk 20 ml 85 %-os H_3PO_4 -at és acetonnal 200 ml-re töltjük. Sötét üvegben, hűtőszekrényben tároljuk.

α, α' -dipiridil reagens:

1 g α, α' -dipiridil oldva 100 ml etanolban.

Reagensok a "Lipidek vizsgálata" című gyakorlathoz:

1. Dragendorff reagens:

a.) 1,7 g bizmut(III)-nitrátot és 20 g borkősavat oldunk 80 ml vízben.

b.) 16 g kálium-jodidot oldunk 40 ml vízben.

Reagens oldat: egyenlő térfogatú a. és b. oldatot elegyítünk. A reagens hűtőben tartva néhány hónapig stabil.

Előhívó oldat: 10 g borkősavat oldunk 50 ml vízben és 10 ml reagens oldatot adunk hozzá.

2. Molibdenát reagens:

Kb. 5-10%-os etanos molibdát-foszforsav oldat. A foltok intenzívebbé tételéhez a bepermetezett lemezt melegítsük 120°C-on.

Reagensek a "Nukleinsavak vizsgálata" című gyakorlathoz:

1. Difenilamin oldat:

1,5 g difenilamin, 1,5 ml cc.H₂SO₄, 100 ml jégcet elegyében oldva.

2. NaCl-Na dodecilszulfát oldat:

0,2 M-os NaCl, 0,05%-os Na-dodecilszulfát, 0,05 M-os EDTA, pH=8.

3. Orcin-oldat:

0,4 g orcin 0,27 g ferri-ammonium-szulfát oldva 10 ml desztillált vízben amihez mérés előtt 1 ml-hez 19 ml cc.HCl-t adunk.

4. 10%-os ammonium-molibdenát oldat:

10 g vegyület oldva 100 ml 10 N kénsavban.

5. Foszfor törzsoldat:

1.096 g KH₂PO₄ -ot oldunk 250 ml vízben. Az oldatot mérés előtt tízszeresére hígítjuk.

Reagensek a "Fehérjék vizsgálata" című gyakorlathoz

1. Biuret reagens:

3 g kristályos rézsulfátot és 6 g kálium-nátrium-tartarátot kb. 500 ml desztillált vízben oldunk fel, majd hozzáadunk állandó keverés közben 300 ml 20%-os nátrium-hidroxidot és feltöltjük 1000 ml-re.

2. Fenolos víz:

30 ml fenolt desztillált vízzel 100 ml-re egészítjük ki.

3. Fehérjeoldat kicsapáshoz:

A tojásfehérjét 19-20-szoros térfogatú desztillált vízzel összekeverjük és többszörös gézrétegen megszűrjük.

4. Fehérjeoldat dialízishez és kisózáshoz:

Egy tojásfehérjét oldunk 250 ml desztillált vízben és 100 ml telített NaCl-ban majd gézrétegen szűrjük.

5. KI-os higanyjodid:

0,5 g HgI_2 -ot 50 ml desztillált vízhez adunk és addig adunk hozzá KI-ot amíg a HgI_2 fel nem oldódik.

6. Kromatografáló puffer pH= 3,28

14,1 g citromsavat, 8 g NaOH-t, 12,3 ml 37%-os HCl-ot és 100 ml glicerint oldunk desztillált vízben és 1000 ml-re egészítjük ki.

7. Millon reagens:

1 ml higanyt 9 ml 1,5 fs-ú salétromsavban oldunk (óvatosan jól szívó fülke alatt). Desztillált vízzel 2-szeresére hígítjuk, (azonos térfogatú desztillált vízzel) majd néhány órai állás után zsugorított üvegszűrőn szűrjük.

8. 30%-os poliakrilamid:

- 29,2 g akrilamid és 0,8g biszakrilamid 100 ml-es mérőlombikban desztillált vízben oldva. (40°C-on, sötétben egy hónapig eltartható.)

9. 1,5 M-os Tris-HCl puffer, pH=8,8:

18,15 g Tris-t feloldunk 60 ml desztillált vízben, az oldat pH-ját 2 M-os sósavval (kb. 12,5 ml kell) 8,8-re állítjuk, majd 100 ml-re egészítjük ki.
Tris=trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán.

10. 0,5 M-os Tris HCl puffer, pH=6,8:

6 g Trist feloldunk 60 ml desztillált vízben, az oldat pH-ját 2 M-os sósavval (kb. 16,5 ml kell) 6,8-re állítjuk, majd 100 ml-re kiegészítjük.

11. 10%-os SDS oldat (SDS=nátrium-lauril-szulfát):

10 g SDS-t gyenge kevertetés közben oldunk 100 ml desztillált vízben.

12. Minta puffer:

4 ml desztillált víz, 1 ml 10. puffer, 0,8 ml glicerín, 1,6 ml 11. oldat, 0,4 ml 2-merkaptóetanol és 0,5 ml 0,05%-os brómfenolkék oldat.

13. Elektrolizáló puffer, pH=8,3:

15 g Trist, 72 g glicint és 5 g SDS-t gyenge kevertetés közben oldunk desztillált vízben 1000 ml-es mérőlombikban. Futtatás előtt 60 ml-t 300 ml-re hígítunk belőle.

14. 10%-os ammónium-perszulfát, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, (frissen készítve):

10 mg vegyület oldva 100 µl desztillált vízben.

15. 0,1%-os Coomassie-blue a gélek festéséhez:

0,5 g Coomassie-blue-t és 250 g TCA-t oldunk desztillált vízben 500 ml-es mérőlombikba.

16. Mosó oldat:

8 tf.%-os ecetsav (40 ml ecetsav 500 ml-re hígítva).